



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101952316 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 01

(21) 申请号 200980101955. 3

(22) 申请日 2009. 01. 09

(30) 优先权数据

61/010, 734 2008. 01. 11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 07. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/000162 2009. 01. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/089062 EN 2009. 07. 16

(83) 生物保藏信息

PTA-9699 2009. 01. 08

PTA-9701 2009. 01. 09

(73) 专利权人 亚德赫伦医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·G·麦卡瑟

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 尚继栋

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2004048411 A2, 2004. 06. 10, 权利要求
45, 51, 52, 66, 说明书第 112, 121, 133 页.

W0 9957149 A2, 1999. 11. 11, 序列 85 和 99,
权利要求 16, 20, 说明书实施例 2 及第 130-142
页.

KIENER HANS P ET AL.. Building
the synovium: cadherin-11 mediates
fibroblast-like synoviocyte cell-to-cell
adhesion. 《ARTHRITIS RESEARCH &
THERAPY》. 2005, Pages 49-54.

审查员 管冰

权利要求书1页 说明书29页

序列表6页 附图27页

(54) 发明名称

用于治疗炎性关节障碍的钙黏着蛋白-11
EC1 结构域拮抗剂

(57) 摘要

本发明涉及钙黏着蛋白-11 拮抗剂以及包括
钙黏着蛋白-11 拮抗剂的组合物。本发明还涉及
通过给予治疗有效量的一种钙黏着蛋白-11 拮
抗剂来治疗哺乳动物受试者体内的炎性关节障碍
(例如, 类风湿性关节炎) 的方法。

1. 一种分离的抗体,其中所述抗体是由 ATCC 登录号 PTA-9699 的杂交瘤 H1M1 或 ATCC 登录号 PTA-9701 的杂交瘤 H14 产生的整个抗体或其抗原结合片段。

2. 如权利要求 1 所述的分离的抗体,其中该抗原结合片段是选自下组,其组成为:一种 Fab、Fab'、F(ab')₂以及 scFv。

3. 分离的抗体在制备用于治疗有需要的哺乳动物受试者体内的类风湿性关节炎的药物中的用途,其中所述抗体是由 ATCC 登录号 PTA-9699 的杂交瘤 H1M1 或 ATCC 登录号 PTA-9701 的杂交瘤 H14 产生的整个抗体或其抗原结合片段。

4. 如权利要求 3 所述的用途,其中该哺乳动物受试者是人。

5. 如权利要求 3 所述的用途,其中所述药物是用于全身给药的药物。

6. 如权利要求 3 所述的用途,其中所述药物是用于静脉内给药的药物。

7. 如权利要求 3 所述的用途,其中所述药物是用于通过直接注射到一个关节中来进行给药的药物。

8. 如权利要求 3 所述的用途,其中所述药物还包含一种缓解疾病的抗风湿药。

9. 如权利要求 8 所述的用途,其中该缓解疾病的抗风湿药是甲氨蝶呤。

10. 如权利要求 3 所述的用途,其中所述药物还包含一种抗炎剂。

11. 如权利要求 10 所述的用途,其中该抗炎剂是一种 NSAID 或类固醇。

12. 如权利要求 10 所述的用途,其中该抗炎剂是一种缓解疾病的抗风湿药物或一种重组蛋白。

13. 一种药物组合物,包括一种分离的抗体以及一种药学上可接受的载体,其中所述抗体是由 ATCC 登录号 PTA-9699 的杂交瘤 H1M1 或 ATCC 登录号 PTA-9701 的杂交瘤 H14 产生的整个抗体或其抗原结合片段。

14. 如权利要求 13 所述的药物组合物,进一步包括一种缓解疾病的抗风湿药。

15. 如权利要求 14 所述的药物组合物,其中该缓解疾病的抗风湿药是甲氨蝶呤。

16. 如权利要求 13 所述的药物组合物,进一步包括一种抗炎剂。

17. 如权利要求 16 所述的药物组合物,其中该抗炎剂是一种 NSAID 或类固醇。

18. 如权利要求 16 所述的药物组合物,其中该抗炎剂是一种缓解疾病的抗风湿药物或重组蛋白。

19. 一种分离的核酸,该核酸编码如权利要求 1 所述的抗体。

20. 一种载体,其包含如权利要求 19 所述的分离的核酸。

21. 一种分离的细胞,该细胞表达如权利要求 1 所述的抗体。

22. 一种表达与哺乳动物钙黏着蛋白-11 蛋白的 EC1 结构域特异性结合的抗体的细胞,其中该细胞是 ATCC 登录号 PTA-9699 的杂交瘤 H1M1 的细胞。

23. 一种表达与哺乳动物钙黏着蛋白-11 蛋白的 EC1 结构域特异性结合的抗体的细胞,其中该细胞是 ATCC 登录号 PTA-9701 的杂交瘤 H14 的细胞。

24. 一种与哺乳动物钙黏着蛋白-11 蛋白的 EC1 结构域特异性结合的抗体,其中所述抗体由 ATCC 登录号 PTA-9699 的杂交瘤 H1M1 产生。

25. 一种与哺乳动物钙黏着蛋白-11 蛋白的 EC1 结构域特异性结合的抗体,其中所述抗体由 ATCC 登录号 PTA-9701 的杂交瘤 H14 产生。

用于治疗炎性关节障碍的钙黏着蛋白-11EC1 结构域拮抗剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求了于 2008 年 1 月 11 日提交的美国临时申请号 61/010,734 的权益。以上申请的全部传授内容都通过引用结合在此。

[0003] 发明背景

[0004] 患有晚期慢性关节炎的患者忍受着严重的关节退化（包括骨和软骨破坏），这导致长期疼痛、畸形、关节功能损失、运动减少、并且缩短的寿命。关节炎与关节中细胞和炎性物质的数量增加相关联，这引起了刺激、软骨的磨损、以及关节内层（joint lining）的肿胀。已知几种不同的自身免疫障碍在关节中触发了不适当的或错误导向的炎症，在遭受这些疾病的个体的关节中导致了慢性炎症。常见的炎性关节障碍（inflammatory joint disorder）包括类风湿性关节炎、银屑病关节炎、莱特尔氏综合征、以及强直性脊柱炎。

[0005] 类风湿性关节炎（RA）是最常见的炎性关节炎形式，并且据估计影响美国大约 1% 的人口、或大约 210 万美国人。RA 是一种慢性病，其特征在于关节的内层、或滑膜的炎症，并且随着时间可以导致显著的骨和软骨的损害。与男性相比，RA 在女性中更为常见，并且多达 3% 的女性在她们的一生中可能发展成类风湿性关节炎。目前，RA 的病因是未知的。

[0006] RA 可以导致长期的关节损害，这造成了慢性疼痛、功能损失以及失能。此外，最近的研究表明患有 RA 的人、特别是那些疾病没有被很好控制的人，可能具有更高的心脏病和中风的风险。因此，RA 是一种主要的国家健康负担，并且对于开发用于防止和治疗类风湿性关节炎、以及其他炎性关节障碍的新型药剂存在着一种迫切的需要。

[0007] 发明概述

[0008] 在一个实施方案中，本发明涵盖了：一种钙黏着蛋白-11 拮抗剂，该钙黏着蛋白-11 拮抗剂特异性地结合到一种哺乳动物钙黏着蛋白-11 蛋白的一个细胞外结构域（EC1）上，并且抑制了表达该哺乳动物钙黏着蛋白-11 的细胞的聚集。在一个具体的实施方案中，该钙黏着蛋白-11 拮抗剂是一种抗体或抗体片段。在另一个实施方案中，该钙黏着蛋白-11 拮抗剂是一种融合蛋白，该融合蛋白包括一种钙黏着蛋白-11 蛋白的 EC1 结构域（例如，SEQ ID NO :3）。

[0009] 在另一个实施方案中，本发明涉及治疗哺乳动物受试者（例如，人）体内的炎性关节障碍的多种方法。该方法包括对该哺乳动物受试者给予本发明的治疗有效量的一种钙黏着蛋白-11 拮抗剂，由此在该哺乳动物中产生一种令人希望的治疗效应。在一种具体的实施方案中，本发明的这些方法可用于治疗类风湿性关节炎。

[0010] 在另一个实施方案中，本发明涵盖了一种药物组合物，该药物组合物包括本发明的一种钙黏着蛋白-11 拮抗剂以及一种药学上可接受的载体。在一个实施方案中，该药物组合物进一步包括一种第二试剂，如，一种缓解疾病（disease-modifying）的抗风湿药或抗炎剂。

[0011] 附图简要说明

[0012] 本专利或申请文件包含至少一个彩绘的图。带有彩图的本专利或专利申请公开文

件的副本在要求和支付必要的费用时将由局方 (the Office) 将提供。

[0013] 图 1A 是一种蛋白质印迹, 示出了使用抗 Cad-11 抗体 23C6、13C2、以及 27F3 来检测钙黏着蛋白 -11-EC1-5-Fc 融合蛋白 (见实心箭头)。这些抗体并未识别也存在于该膜上的钙黏着蛋白 -11-EC1-Fc 以及钙黏着蛋白 -11-EC1/2-Fc 融合蛋白 (见空心箭头, 指出在该印迹上钙黏着蛋白 -11-EC1-Fc 以及钙黏着蛋白 -11-EC1/2-Fc 蛋白的位置)。

[0014] 图 1B 是一个图示, 描绘了公布的钙黏着蛋白 -11 抗体 13C2、23C6、以及 5F82 与人类 Cad-11-EC1-5-Fc 融合蛋白 (而非 Cad-11-EC1-Fc 融合蛋白) 的结合, 正如通过 ELISA 所确定。相比之下, EC1 抗体 H1M1 与 Cad-11-EC1-Fc 融合蛋白以及 Cad-11-EC1-5-Fc 融合蛋白这两者相结合。

[0015] 图 2 是涉及到钙黏着蛋白结合的人类 Cad-11 的 EC1 结构域的前 34 个氨基酸 (SEQ ID NO :3)、MN-Cad 的 EC1 结构域的前 34 个氨基酸 (SEQ ID NO :4)、以及 Cad-8 (SEQ ID NO :5) 的 EC1 结构域的前 34 个氨基酸的氨基酸序列比对。包含延伸至一种钙黏着蛋白反受体的口袋中的多个残基的供体序列是通过在序列的左侧一半作下划线来表示的, 并且该口袋序列的多个残基是通过在 SEQ ID NO :3 中的序列的右侧一半作下划线来表示的。

[0016] 图 3 是一个图示, 描绘了一种钙黏着蛋白 -11- 结合 Fab 与一种人类 Cad-11-EC1 结构域肽、连同 Cad-11-EC1-Fc 融合蛋白 (而非 Cad-8 或 MN-Cad EC1 结构域肽) 的结合, 正如通过 ELISA 所确定。克隆 7 证明了显著结合到 Cad-11EC1 结构域肽以及融合蛋白上, 而非 MN-Cad 或 Cad-8EC1 结构域肽。

[0017] 图 4 是一个图示, 描绘了来自体外 Cad-11 细胞聚集测定的数据。加入到培养基中的 Cad-11 拮抗剂 (如, 由抗 Cad-11 抗体 13C2 制备的一种 Fab)、或不同浓度的抗钙黏着蛋白 -11EC1Fab (它针对钙黏着蛋白 -11 的 EC1 结构域的前 35 个氨基酸) (被指定为 EC1Fab 克隆 7) 阻止了 Cad-11 介导的 431-D-11 细胞的聚集。抗钙黏着蛋白 -11EC1Fab (克隆 7) 在所有测试浓度 (在 $0.3 \mu\text{g/ml}$ 至 $10 \mu\text{g/ml}$ 的范围内) 下抑制了一种 431-D-11 表皮样癌细胞的聚集。相比之下, 由 13C2 抗钙黏着蛋白 -11 抗体制备的 Fab 仅在 $10 \mu\text{g/ml}$ 的浓度下抑制细胞的聚集。

[0018] 图 5 是一个图示, 描绘了来自第二种体外 Cad-11 细胞聚集测定的数据。431-D-11 细胞的聚集百分率是在加入 SME 培养基 (被指定为对照)、不同浓度的一种融合蛋白 (包括融合至人类 IgG2 铰链域、CH2 以及 CH3 结构域上的 Cad-11 的 EC1 结构域) (被指定为 Cad-11-EC1-Fc)、不同浓度的一种抗钙黏着蛋白 -11EC1Fab (它针对钙黏着蛋白 -11 的 EC1 结构域的前 35 个氨基酸) (被指定为 Cad-11EC1Fab)、或不同浓度的一种对照抗绿色荧光蛋白 (抗 -GFP) Fab (被指定 GFPfAb) 之后 40 分钟示出的。抗钙黏着蛋白 -11EC1Fab (克隆 7) 在 $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、以及 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 的浓度下抑制了表达 Cad-11 的 431-D-11 细胞的聚集。EC1-Fc 融合蛋白在 $3 \mu\text{g/ml}$ 的浓度下抑制了 431-D-11 细胞的聚集。相比之下, 抗 -GFP Fab 在任何这些测试浓度下都没有显著地抑制细胞的聚集。

[0019] 图 6 是一个图示, 描绘了通过不同的抗钙黏着蛋白 -11EC1Fab 来抑制 Cad-11 介导的细胞聚集, 这些抗钙黏着蛋白 -11EC1Fab 具有对于单独的 Cad-11 (EC1fAb 克隆 7 以及克隆 4)、Cad-11 与 Cad-8 (EC1fAb 克隆 6)、或 Cad-11 与 MN-Cad (EC1fAb 克隆 5) 的结合特异性, 这是使用体外细胞聚集测定来进行的。相对于对照物 (D-11SME ; 左柱) 所测试的所有 Fab 抑制了 431-D-11 细胞的聚集。

[0020] 图 7 是一个图示,描绘了通过抗-Cad-11Fab 来抑制 Cad-11 介导的细胞的聚集,这些抗-Cad-11Fab 具有对于单独的 Cad-11 (EC1fAb 克隆 7)、或 Cad-11 与 MN-Cad (EC1fAb 克隆 8) 的结合特异性,这是使用体外细胞聚集测定来进行的。所测试的这些 Fab 的特异性在每种 Fab 名称旁边的括号中示出。相对于对 GFP 特异性的对照 Fab (左柱),这两种钙黏着蛋白特异性 Fab 均抑制了细胞聚集 (中间柱和右柱)。

[0021] 图 8 显示人类 Cad-11-EC1-hIgG2-Fc1 融合蛋白 (Cad-11-EC1-Fc) 的核苷酸 (DNA) 序列 (SEQ ID NO:6)。这种人类钙黏着蛋白-11 胞外域的序列以斜体字显示,BglIII 位点是加下划线的,并且对这种人类 IgG2-Fc1 区域进行编码的序列以黑体字母显示。

[0022] 图 9 示出了人类 Cad-11-EC1-hIgG2-Fc1 融合蛋白 (Cad-11-EC1-Fc) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)。这种人类钙黏着蛋白-11 胞外域的序列以斜体字显示,由 BglIII 位点编码的序列是加下划线的,并且这种人类 IgG2-Fc1 区的序列以黑体字母显示。

[0023] 图 10 是已经用考马斯蓝染色的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的图像,它对应地示出了对应于纯化的 Cad-11-EC1-hIgG2-Fc1 (中间泳道) 以及 Cad-11-EC1/2-hIgG2-Fc1 (右侧泳道) 融合蛋白的单体形式的主导强条带,之后使用蛋白 A 柱从细胞培养基中纯化。分子量标准显示在左侧泳道中。

[0024] 图 11 是蛋白质印迹,示出了使用偶联辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗人 IgG 抗体来检测人类 Cad-11-EC1-hIgG2-Fc1 (中间泳道) 以及 Cad-11-EC1/2-hIgG2-Fc1 (右侧泳道) 融合蛋白。在每个泳道中所观察到的主导条带对应于这些融合蛋白的单体形式的位置。这些融合蛋白的二聚体形式的位置由于不完全的还原条件也是可见的 (见不太强的更高的分子量条带)。分子量标准显示在左侧泳道中。

[0025] 图 12 是一个图示,描绘了与未经处理的细胞相比 Cadd-11-EC1-Fc 融合蛋白以及小鼠抗-Cad-11 抗体 13C2 在所指示的浓度下抑制了表达 Cad-11 的人类成纤维细胞样滑膜细胞侵入到基质胶塞中,标记为侵入。数据是从两个独立实验汇集的。

[0026] 图 13A 和 B 是图示,描绘了来自两种体外 Cad-11 细胞聚集测定的数据。表达 Cad-11 的 431-D-11 细胞的聚集百分率是在加入 SME 培养基 (被指定为对照) 或一种 Cad-11 融合蛋白之后 40 分钟而示出的。图 13A 示出了在不同浓度的一种融合蛋白 (包括融合至人类 IgG 2 铰链域、CH2 以及 CH3 结构域上的 Cad-11 的 5 个胞外域) (被指定为 Cad-11-EC1-5-Fc) 的存在下对聚集的抑制。图 13B 示出了不同浓度的一种融合蛋白 (包括融合至人类 IgG2 铰链域、CH2 以及 CH3 结构域的 Cad-11 的 N 端胞外域 (EC1 结构域)) (被指定为 Cad-11-EC1-Fc)、或 Cad-11-EC1-5-Fc) 对聚集的抑制。

[0027] 图 14A 至 C 示出了人类钙黏着蛋白-11cDNA 序列 (SEQ ID NO:1;见 Genbank 登记号 NM 001797)。

[0028] 图 15 示出了人类钙黏着蛋白-11 蛋白序列 (SEQ ID NO:2;见 Genbank 登记号 NP001788)。

[0029] 图 16 是一个图示,描绘了在来自肽 4 杂交瘤 (HL) 的培养基、或对照杂交瘤培养基 (Media) 中的抗体与包含 Cad-11、Cad-8、或 MN-Cad 的 EC1-2 结构域的蛋白的结合水平,正如通过 ELISA 所确定。

[0030] 图 17A 至 C 是代表性的图示,描绘了细胞染色的强度 (MFI;平均荧光强度) 作为 H14 抗体与表达 Cad-11- 的 431-D-11 细胞的结合的一种量度。

[0031] 图 17D 至 F 是代表性的图示,描绘了相对于图 17A 至 C、431-D 细胞染色缺失 (MFI ;平均荧光强度),这表明 H14 抗体与 Cad-11 阴性细胞的结合的缺乏。

[0032] 图 17G 至 I 是代表性的图示,描绘了细胞染色的强度 (MFI ;平均荧光强度) 作为 H1M1 抗体与表达 Cad-11- 的 431-D-11 细胞的结合的一种量度。

[0033] 图 18A 是一个图示,描绘了在不同浓度的抗体下 H14 抗体与表达 Cad-11- 的细胞的结合、以及 H14 与 Cad-11 阴性对照细胞结合的缺失,正如由细胞染色的强度 (MFI ;平均荧光强度) 所测量。

[0034] 图 18B 是一个图示,描绘了在不同浓度的抗体下 H1M1 抗体与表达 Cad-11- 的细胞的结合、以及 H1M1 与 Cad-11 阴性对照细胞结合的缺失,正如由细胞染色的强度 (MFI ;平均荧光强度) 所测量。

[0035] 图 19A 是一个图示,描绘了在不同的抗体浓度下 H14 抗 Cad-11 抗体与 Cad-11 以及 Cad-8EC1 结构域肽的结合程度,正如通过 ELISA 所确定。

[0036] 图 19B 是一个图示,描绘了在不同的抗体浓度下 H14 抗 Cad-11 抗体与 Cad7、MNCad、Cad9、Cad18、Cad20、或 Cad24EC1 结构域肽的结合的缺失,正如通过 ELISA 所确定。

[0037] 图 20 是一个图示,描绘了在不同的抗体浓度下 H1M1 抗 Cad-11 抗体与 Cad-11 以及 Cad-8EC1 结构域肽的结合,正如通过 ELISA 所确定。

[0038] 图 21A 是一个图示,描绘了 H1M1 抗 Cad-11 抗体与不同的 Cad-11EC1 结构域肽免疫原 (PEP1、PEP2、PEP3、以及 PEP4)、连同 Cad-11EC1 结构域融合蛋白 (EFL) 以及人类 IgG 对照 (Fc 段) (Fc block) 的结合程度,正如通过 ELISA 所确定。

[0039] 图 21B 是一个图示,描绘了 H14 抗 Cad-11 抗体与不同的 Cad-11EC1 结构域肽免疫原 (PEP1、PEP2、PEP3、以及 PEP4)、连同 Cad-11EC1 结构域融合蛋白 (EFL) 以及人类 IgG 对照 (Fc 段) 的结合程度,正如通过 ELISA 所确定。

[0040] 图 22 个是一种示意图,描绘了人类钙黏着蛋白 -11 的 EC1 结构域的前 37 个氨基酸的序列、以及由肽 1-4 中的每一个所涵盖的这种序列的部分。肽 3 上游的由肽 2 和 4 共有的氨基酸残基在加框区中被加强显示。直接参与 Cad-11 与 Cad-11 结合的多个氨基酸是加下划线的。

[0041] 图 23A 是一个照片,示出了用一种对照同种型抗体处理的聚集的表达 Cad-11 的细胞大块。

[0042] 图 23B 是一个照片,示出了 H1M1 处理的表达 Cad-11- 的细胞小簇,这些细胞小簇未发展形成在图 23A 中所观察到的大块。

[0043] 图 23C 是一个照片,示出了未经处理的亲本 Cad-11 阴性细胞保持为单细胞群或双细胞群。

[0044] 图 23A 是一个照片,描绘了表达 Cad-11 的细胞的培养物,该培养物具有聚集的细胞大块。

[0045] 图 23B 是一个照片,描绘了在用 H14Cad-11EC1 结构域抗体处理之后表达 Cad-11 的细胞的培养物,该培养物主要具有单细胞,这些单细胞相对于在图 24A 中所示的细胞具有小而稀少的细胞簇。

[0046] 图 25 是一个图示,描绘了与未经处理的对照小鼠相比在用增加剂量的 H1M1 抗 Cad-11 抗体处理的小鼠中对与关节炎相关的关节肿胀的抑制。

[0047] 图 26 是一个图示,描绘了与未经处理的对照小鼠相比在每隔一天用 0.3mg 的 H14 或 H1M1 抗 Cad-11 抗体处理的小鼠中对与关节炎相关的关节肿胀的抑制。

[0048] 图 27 是一个图示,示出了与未经处理的对照物相比在小鼠模型中用 0.3mg 的 H1M1 或 H14 抗体进行处理延迟了关节炎的发展。

[0049] 图 28 是一个图示,描述了来自肽 3 杂交瘤的培养基 (HL) 或对照杂交瘤培养基 (Media)、包含抗体的培养基与 Cad-11、Cad-8、以及 MN- 钙黏着蛋白、或 Cad-11EC1-Fc 融合蛋白的 EC1-2 结构域的结合程度。

[0050] 图 29 是一个图示,描绘来自这些肽 3 杂交瘤的抗 Cad-11 抗体与表达人类 Cad-11 蛋白的细胞 (见箭头) 以及表达 Neos、未表达 Cad-11 的对照细胞的结合程度。

[0051] 发明详细说明

[0052] 定义

[0053] 如在此所使用的,术语“钙黏着蛋白 -11”、“Cad-11”、以及“OB- 钙黏着蛋白”是指一种自然发生的或内源性钙黏着蛋白 -1 ((例如,哺乳动物,例如人类) 蛋白,并且指具有一种氨基酸序列的多个蛋白,该氨基酸序列与自然发生的或内源性钙黏着蛋白 -11 蛋白的氨基酸序列相同 (例如,重组蛋白、合成的蛋白)。因此,术语“钙黏着蛋白 -11”、“Cad-11”、以及“OB- 钙黏着蛋白”(它们在此是可互换使用的) 包括一种钙黏着蛋白 -11 蛋白 (例如,哺乳动物、人类) 的多态的或等位基因的变体以及其他同种型,它们是通过 (例如) 在哺乳动物 (例如人类、非人的灵长类) 中自然发生的替代性剪接或其他细胞加工所产生的。优选地,这种钙黏着蛋白 -11 蛋白是一种人类蛋白,该蛋白具有 SEQ IDNO :2 的氨基酸序列 (见 Genbank 登记号 NP001788 和图 15)。

[0054] 如在此所定义的,一种“钙黏着蛋白 -11 拮抗剂”是一种试剂 (例如,抗体、融合蛋白、肽、模拟肽、小分子、核酸),该试剂特异性地结合到一种钙黏着蛋白 -11 蛋白的一个 EC1 结构域上并且在细胞中抑制 (例如,减少、防止) 一种或多种钙黏着蛋白 -11- 介导的活性。钙黏着蛋白 -11- 介导的活性包括但不限于:一种钙黏着蛋白 -11 蛋白以一种同型方式与一种或多种其他钙黏着蛋白 -11 蛋白的结合、表达钙黏着蛋白 -11 的细胞的聚集、酶 (例如,胶原酶、丝氨酸蛋白酶、MMP1、MMP3、MMP13) 的表达或活性的诱导、以及细胞因子或生长因子 (例如,IL-6、IL-8、或 RANKL、或 TRANCE) 的诱导。在一个实施方案中,该钙黏着蛋白 -11 拮抗剂可以抑制一种钙黏着蛋白 -11 蛋白与一种或多种其他钙黏着蛋白 -11 蛋白的结合,这是通过 (例如) 阻断在一种 Cad-11 蛋白 (例如,在一种细胞的表面上表达的一种 Cad-11 蛋白) 的 EC1 结构域中的供体 序列与一个或多个其他 Cad-11 蛋白 (例如,在另一种细胞的表面上表达的一种或多种 Cad-11 蛋白) 的 EC1 结构域中的口袋序列之间的相互作用来进行的。

[0055] 如在此所使用的,“特异性地结合”到一种钙黏着蛋白 -11 蛋白的一个 EC1 结构域上的钙黏着蛋白 -11 拮抗剂是指一种钙黏着蛋白 -11 拮抗剂,该钙黏着蛋白 -11 拮抗剂以一种亲和力 (例如,一种结合亲和力) 结合到 (例如,在生理条件下) 一种钙黏着蛋白 -11 蛋白的一个 EC1 结构域上,该亲和力比该钙黏着蛋白 -11 拮抗剂结合到另一种钙黏着蛋白 (例如, MN- 钙黏着蛋白、钙黏着蛋白 -8) 的一个 EC1 结构域上的亲和力大至少约 5 倍、优选至少约 10 倍。在一种具体的实施方案中,特异性地结合到一种钙黏着蛋白 -11 蛋白的一个 EC1 结构域上的钙黏着蛋白 -11 拮抗剂以一种亲和力与一种表位相结合,该表位

存在于 SEQ ID NO :3、人类钙黏着蛋白 -11 的 EC1 结构域的 N 端部分中,该亲和力比该钙黏着蛋白 -11 拮抗剂与存在于 SEQ ID NO :4、人类 MN 钙黏着蛋白的 EC1 结构域的 N 端部分中的一种表位相结合的亲和力以及该钙黏着蛋白 -11 拮抗剂与存在于 SEQ ID NO :5、人类钙黏着蛋白 -8 的 EC1 结构域的 N 端部分中的一种表位相结合的亲和力大至少约 5 倍、优选至少约 10 倍。

[0056] 如在此使用的,术语“抗体”旨在涵盖整个抗体以及抗体片段(例如,抗体的抗原结合片段,例如 Fv、Fc、Fd、Fab、Fab'、F(ab')₂、以及 dAb 片段)。“抗体”是指多克隆和单克隆抗体,并且包括自然发生的以及工程化处理的抗体。因此,术语“抗体”包括例如:人类的、嵌合的、人源化的、灵长源化的(primatized)、镶饰的(veneered)、单链的、以及结构域抗体(dAb)。(参见例如 Harlow et al., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

[0057] 术语“表位”是指由一种免疫球蛋白 V_H/V_L对常规地结合的一种结构单元。一种表位限定了对一种抗体的最小结合部位,并且因此代表一种抗体的靶特异性。

[0058] 术语“融合蛋白”是指一种自然发生的、合成的、半合成的、或重组的单一蛋白分子,该蛋白分子包括两种或多种异源多肽的全部或一部分。

[0059] 术语“多肽”是指一种氨基酸聚合体,而没有特定的长度;因此,肽、低聚肽、以及蛋白是包括在一种多肽的定义之内的。

[0060] 如在此所使用的,术语“肽”是指一种化合物,该化合物由从大约 2 个至大约 100 个氨基酸残基组成,其中一个氨基酸的氨基基团是通过一种肽键而连接至另一种氨基酸的羧基基团上的。此类肽在长度上典型地是小于约 100 个氨基酸残基,并且优选为约 10、约 20、约 30、约 40、或约 50 个残基。

[0061] 如在此使用的,术语“模拟肽”是指多种分子,这些分子不是肽或蛋白、但是它们模拟了这些肽或蛋白的结构多个方面。模拟肽拮抗剂可以通过常规的化学方法来制备的(参见,例如 Damewood J. R. “Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry” in *Reviews in Computational Biology*, 2007, Vol. 9, pp. 1-80, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1996; Kazmierski W. K., “Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols,” Humana Press, New Jersey, 1999)。

[0062] 如在此所定义的,“治疗”是将一种具体的治疗性或预防性(prophylactic)试剂给予受试者(例如,一种哺乳动物、人),这产生了对于该受试者的一种令人希望的治疗性或预防性益处。

[0063] 如在此所定义的,一种“治疗方案”是一种方案,其中将一种或多种治疗性或预防性试剂以一种具体的剂量(例如,水平、量值、数量)并且在一种具体的时间表上或以具体的间隔(例如,数分钟、数天、数周、数月)给予哺乳动物受试者。

[0064] 如在此所定义的,一种“治疗有效量”是一种量值,该量值足以在给药条件下达到所希望的治疗性或预防性效应,例如足以在一个关节中抑制(即降低、防止)炎症(例如,通过抑制细胞(例如,表达钙黏着蛋白 -11 的滑膜细胞)的聚集)的一种量值。一种治疗效力(例如,在一个关节中降低炎症和/或在一个关节中防止炎症)可以通过适当的方法(例如,成像方法,如 MRI、NMR、CT)来确定的。

[0065] 钙黏着蛋白

[0066] 钙黏着蛋白属于 Ca^{2+} 依赖性黏附分子大家族, 这些分子以一种同型的方式通过结合到其他钙黏着蛋白上而介导了细胞黏附 (MJ Wheelock and KR Johnson, Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 19 :207-235(2003))。经典的钙黏着蛋白是单次跨膜蛋白质, 它们含有五个细胞外钙黏着蛋白 (EC) 结构域 (每个的长度大约为 110 个氨基酸)、一个跨膜区、以及一个保守的胞质域。钙黏着蛋白基于在这些 EC 结构域之间的同源性程度而被分成 I 型或 II 型钙黏着蛋白。II 型钙黏着蛋白包括人类钙黏着蛋白 -5、-6、-8、-11、以及 -12、以及 MN- 钙黏着蛋白。这些胞外域中的每一个在介导细胞间结合中的作用的相对重要性是不清楚的。

[0067] 钙黏着蛋白 -11 在滑膜细胞中的活性

[0068] 钙黏着蛋白 -11 在可活动的关节的滑液内层中介导了滑膜细胞与滑膜细胞的结合 (Valencia et al., J. Exp. Med. 200(12) :1673-1679(2004) ;Kiener and Brenner, Arthritis Res Ther. 7(2) :49-54(2005))。一种融合蛋白 (该融合蛋白包括人类钙黏着蛋白 -11 的所有五种细胞外钙黏着蛋白结构域、融合至人类 IgG₂ 的铰链 -CH₂-CH₃ 结构域上) 在体外抑制了滑膜细胞内层的形成 (Kiener et al., Am. J. Pathol. 168(2006))。另外, 拮抗性的抗钙黏着蛋白 -11 抗体以及一种融合蛋白 (包括鼠钙黏着蛋白 -11 的 EC1-5、融合至鼠 IgG2a 的铰链 -CH₂-CH₃ 结构域上) 在类风湿性关节炎的鼠模型中抑制了炎症和关节肿胀 (Lee et al., Science 315 :1006-1010(2007))。

[0069] 钙黏着蛋白 -11 拮抗剂

[0070] 本发明的一种钙黏着蛋白 -11 拮抗剂可以是特异性地结合到一种钙黏着蛋白 -11 蛋白的一个 EC1 结构域上、并且在细胞中抑制 (例如, 减少、防止) 一种或多种钙黏着蛋白 -11- 介导的活性的任何试剂。钙黏着蛋白 -11- 介导的活性包括但不限于: 在细胞表面上表达钙黏着蛋白 -11 的细胞的聚集、以及多种因子 (例如像, 胶原酶、丝氨酸蛋白酶、MMP1、MMP3、IL-6、IL-8、或 RANKL/TRANCE) 的表达或分泌。该试剂除其他之外还可以是一种抗体、融合蛋白、肽、模拟肽、小分子、或核酸。

[0071] 钙黏着蛋白 -11 抗体

[0072] 如在此所说明的, 与人类钙黏着蛋白 -11 的 EC1 结构域的 N 端部分 (它包括 Cad-11 的供体序列和钙黏着蛋白结合口袋) (例如 SEQ IDNO :3) 内的一种表位相结合的抗体与结合到这种蛋白的其他区域中的表位的抗体相比, 在体外更加有效地阻断了钙黏着蛋白 -11 活性 (见实例 1 和 2)。

[0073] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供看一种抗体或它的抗原结合片段, 它与一种表位相结合 (例如, 特异性地结合), 该表位存在于一种钙黏着蛋白 -11 蛋白的 EC1 结构域的 N 端部分中, 该部分包括 Cad-11 的供体序列和钙黏着蛋白结合口袋。术语“抗体”旨在涵盖所有类型的多克隆和单克隆抗体 (例如, 人类的、嵌合的、人源化的、灵长源化的、镶饰的、单链、结构域抗体 (dAb))、以及抗体的抗原结合片段 (例如 Fv、Fc、Fd、Fab、Fab'、F(ab')、dAb)。(参见, 例如 Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。在一种具体的实施方案中, 这种 Cad-11EC1 结构域特异性抗体是一种人类抗体或人源化抗体。Cad-11EC1 结构域特异性抗体还可以被直接或间接地连接至一种细胞毒剂上。

[0074] 特异性地结合到一种 Cad-11 蛋白的 EC1 结构域的 N 端部分上并且抑制该 Cad-11 蛋白活性的其他抗体或抗体片段还可以通过常规的方法或其他适用的技术来进行生产、

构建、工程化处理、和 / 或分离。例如,对于一种钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域特异的抗体可以对抗一种适当的免疫原而产生,例如一种重组哺乳动物(例如,人类)钙黏着蛋白-11EC1 结构域肽(例如 SEQ ID NO:3) 或它的一部分(包括合成分子,例如合成肽)。已经说明了不同的方法(参见,例如 Kohler et al., Nature, 256:495-497 (1975) 以及 Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976); Milstein et al., Nature 266:550-552 (1977); Koprowski et al., U. S. Patent No. 4,172,124; Harlow, E. and D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (ColdSpring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Supplement 27, Summer '94), Ausubel, F. M. et al., Eds., (John Wiley & Sons: New York, NY), Chapter 11, (1991))。抗体还可以通过用表达钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域的细胞(例如,癌细胞 / 细胞系)或被工程化处理为表达钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域的细胞(例如,转染的细胞)对一种适当的宿主(例如,小鼠)进行免疫而产生。(参见,例如 Chuntharapai et al., J. Immunol, 152:1783-1789 (1994); Chuntharapai 等的美国专利号 5,440,021)。为了生产单克隆抗体,可以通过将一种适当的无限增殖性细胞系(例如,一种骨髓瘤细胞系,如 SP2/0 或 P3X63Ag8.653)与产生抗体的细胞进行融合而产生一种杂交瘤。这些产生抗体的细胞可以从用所感兴趣的抗原进行免疫的人或其他适当的动物的外周血、或优选脾或淋巴结而获得的。这些融合的细胞(杂交瘤)可以是使用选择性培养条件来分离的,并且通过有限稀释而被克隆。具有所希望的特异性的、产生抗体的细胞可以通过一种适当的测定来进行选择(例如,ELISA)。

[0075] 抗体片段可以通过酶促切割或通过重组技术而产生的。例如,木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割可以对应地产生 Fab 或 F(ab')₂ 片段。具有必要的底物特异性的其他蛋白酶也可以用于产生 Fab 或 F(ab')₂ 片段。还可以使用抗体基因来产生不同的平截形式的抗体,在这些基因中一种或多种终止密码子已经被引入该自然的终止位点的上游。例如,对一个 F(ab')₂ 重链部分进行编码的嵌合基因可以被设计成包括对该重链的 CH₁ 结构域和绞链区进行编码的 DNA 序列。单链抗体,以及人类的、嵌合的、人源化的、或灵长源化的(CDR 移植的)、或镶饰的抗体,连同嵌合的、CDR 移植的、或镶饰的单链抗体(包括由不同物种衍生的部分),以及类似物也由本发明以及术语“抗体”所涵盖。这些抗体的不同部分可以由常规技术通过化学方式连接在一起,或可以使用遗传工程技术制备为一种连续蛋白。例如,可以对编码了一种嵌合的或人源化的链的核酸进行表达以产生一种连续蛋白。参见,例如 Cabilly 等人,美国专利号 4,816,567; Cabilly 等人,欧洲专利号 0,125,023B1; Boss 等人,美国专利号 4,816,397; Boss 等人,欧洲专利号 0,120,694B1; Neuberger, M. S. 等人, WO 86/01533; Neuberger, M. S. 等人,欧洲专利号 0,194,276B1; Winter, 美国专利号 5,225,539; Winter, 欧洲专利号 0,239,400B 1; Queen 等人,欧洲专利号 0 451 216B1; 以及 Padlan, E. A. 等人, EP 0 519 596A1。还参见 Newman, R. et al., BioTechnology, 10:1455-1460 (1992) (关于灵长源化的抗体), 以及 Ladner 等人, 美国专利号 4,946,778 和 Bird, R. E. et al., Science, 242:423-426 (1988)) (关于单链抗体)。

[0076] 人源化的抗体可以使用标准方法或其他适当的技术、使用合成或重组 DNA 技术来进行生产。对人源化的可变区进行编码的核酸(例如 cDNA) 序列还可以使用 PCR 诱变方法进行构建,从而改变对一种人类或人源化的链进行编码的 DNA 序列,例如来自一种之前被人源化的可变区的 DNA 模板(参见,例如 Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res., 17:

5404(1989)) ;Sato, K. , et al. , Cancer Research, 53 :851-856 (1993) ;Daugherty, B. L. et al. , Nucleic Acids Res. , 19(9) :2471-2476 (1991) ; 以及 Lewis, A. P. and J. S. Crowe, Gene, 101 :297-302 (1991))。使用这些或其他适当的方法,还可以容易地产生多种变体。在一个实施方案中,可以对经克隆的可变区(例如 dAb)进行突变,并且可以选择具有令人希望的特异性的编码变体的序列(例如,来自一种噬菌体文库;参见,例如Krebber等人,美国 5,514,548 ;Hoogenboom等人,WO 93/06213,于1993年4月1日公布)。

[0077] 可以使用产生或分离具有这些必需特异性的抗体的其他适当方法,包括例如从一个文库(例如,噬菌体展示文库)中选择一种重组抗体或抗体结合片段(例如,dAb)的方法、或依赖于对转基因动物(例如,小鼠)进行免疫的方法。能够生产人类抗体表达谱的转基因动物在本领域中是众所周知的(例如,Xenomouse[®] (Abgenix, Fremont, CA)),并且是可以使用适当的方法来生产的(参见,例如Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551-2555 (1993) ;Jakobovits et al., Nature, 362 :255-258 (1993) ;Lonberg等人,美国专利号 5,545,806 ;Surani等人,美国专利号 5,545,807 ;Lonberg等人,WO 97/13852)。

[0078] 在一个实施方案中,本发明涵盖了一种Cad-11抗体,该Cad-11抗体与一种表位相结合,该表位存在于人类Cad-11的EC1结构域的前大约37个氨基酸(SEQ ID NO :13)中。在一种具体的实施方案中,本发明涉及一种Cad-11抗体,该Cad-11抗体与一种表位相结合,该表位存在于SEQ ID NO :10中。在另一个实施方案中,本发明涉及一种Cad-11抗体,该Cad-11抗体与一种表位相结合,该表位包括SEQ ID NO :11。在另一个实施方案中,本发明涉及一种Cad-11抗体,该Cad-11抗体与一种表位相结合,该表位存在于SEQ ID NO :12中。

[0079] 在一个实施方案中,本发明涉及由杂交瘤H1M1(ATCC登录号PTA-9699)产生的一种Cad-11抗体,该抗体已经于2009年1月8日保存在美国种质保存中心(ATCC),P. O. Box 1549, Manassas, Virginia 20108,美国。在另一个实施方案中,本发明提供了由杂交瘤H14(ATCC登录号PTA-9701)产生的一种Cad-11抗体,该抗体已经于2009年1月8日保存在美国种质保存中心(ATCC),P. O. Box 1549, Manassas, Virginia 20108,美国。

[0080] 本发明还涵盖多种抗体,这些抗体与由杂交瘤H1M1产生的一种Cad-11抗体和/或由杂交瘤H14产生的一种Cad-11抗体特异性地竞争结合到一种人类Cad-11蛋白或它的一种含EC1-结构域的部分上(例如SEQ ID NO :3、10、12、13)。在一个具体的实施方案中,特异性地与由杂交瘤H1M1和/或杂交瘤H14产生的一种Cad-11抗体进行竞争的抗体阻断(例如,抑制、减少、防止)由杂交瘤H1M1和/或杂交瘤H14产生的一种Cad-11抗体与一种人类Cad-11蛋白或它的含EC1-结构域的部分(例如,SEQ ID NO :3、10、12、13)的结合。

[0081] 此外,本发明涵盖了多种抗体,这些抗体具有对于一种人类Cad-11蛋白或它的含EC1-结构域的部分(例如,SEQ ID NO :3、10、12、13)的结合亲和力,该结合亲和力是至少与由杂交瘤H1M1产生的一种Cad-11抗体和/或由杂交瘤H14产生的一种Cad-11抗体对于一种人类Cad-11蛋白或它的含EC1-结构域的部分的结合亲和力一样大。

[0082] 钙黏着蛋白-11融合蛋白

[0083] 此外,与包括Cad-11的EC区域的一种更大部分的一种融合蛋白(它包含所有5个EC结构域)相比,仅包含人类Cad-11的EC1结构域(例如,与人类IgG的一部分相融合

的人类 Cad-11 的 EC1 结构域) 的免疫球蛋白融合蛋白在体外更加有效地抑制了 Cad-11 活性。

[0084] 钙黏着蛋白 -11 拮抗剂还涵盖了嵌合的、或融合的蛋白, 这些蛋白包括可操作地连接至一种异源蛋白质的全部或一部分上的人类 Cad-11 的 EC1 结构域的至少约 N- 端的 35 个氨基酸 (SEQ ID NO :2)。“可操作地连接”是指该 Cad-11EC1 结构域的部分与该异源蛋白质被框内融合 (fused in-frame)。该异源蛋白质可以被融合至该蛋白的 N- 端或 C- 端上。例如, 该融合蛋白可以是一种 GST 融合蛋白, 其中这些蛋白序列被融合到一种 GST 序列的 C 端上。其他类型的融合蛋白包括但不限于: 酶性的融合蛋白, 例如 β - 半乳糖苷酶融合蛋白、酵母双杂交 GAL 融合蛋白、聚组氨酸融合体、FLAG- 标记的融合蛋白、GFP 融合蛋白、以及免疫球蛋白 (Ig) 融合蛋白。这种融合蛋白可以促进纯化 (例如, 一种重组融合蛋白的纯化)。在某些宿主细胞中 (例如, 哺乳动物的宿主细胞), 可以通过使用一种异源的信号序列来增加一种蛋白的表达和 / 或分泌。因此, 在另一个实施方案中, 该融合蛋白在其 N 端包含一种异源的信号序列。

[0085] EP-A-0464533 披露了多种融合蛋白, 这些融合蛋白包括免疫球蛋白恒定区的不同部分。该 Fc 在治疗和诊断方面是有用的, 并且因此产生了 (例如) 改进的药物代谢动力学特性 (参见, 例如 EP-A0232262)。在药物发现方面, 例如, 出于高通量筛选测定的目的, 已经将人类蛋白与 Fc 部分进行融合以识别拮抗剂 (Bennett et al., Journal of Molecular Recognition 8 :52-58(1995); Johanson et al., J. Biol. Chem., 270(16) : 9459-9471(1995))。因此, 这项发明还涵盖了可溶的融合蛋白, 这些融合蛋白包含本发明的一种蛋白 Cad-11 拮抗剂、以及不同子类的免疫球蛋白的重链和 / 或轻链的恒定区的不同部分 (例如, IgG、IgM、IgA、IgE)。本发明的免疫球蛋白融合蛋白的优点包括以下各项中的一个或多个: (1) 由于得到的二价的二聚融合蛋白, 对于多价配体的增加的亲合力, (2) 更长的血清半衰期, (3) 经由该 Fc 结构域激活效应细胞的能力, (4) 易于纯化 (例如, 通过蛋白 A 层析)、(5) 对于 Cad-11 的亲合力以及, (6) 阻断 Cad-11 介导的活性的能力。

[0086] 因此, 在具体的实施方案中, 该 Cad-11 拮抗剂是一种融合蛋白, 该融合蛋白包括一种钙黏着蛋白 -11 蛋白的胞外区的一部分, 它包括可操作地连接至一种哺乳动物免疫球蛋白的全部或一部分上的 EC1 结构域的 N- 端部分 (SEQ ID NO :2 的氨基酸 54-90)。在一个具体的实施方案中, 本发明的这些免疫球蛋白融合蛋白并不包括钙黏着蛋白 -11 的胞外区的一部分, 该部分包括在 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-609 内所包含的全部 5 个 EC 结构域。在某些实施方案中, 该人类钙黏着蛋白 -11 胞外区的部分可以包括例如 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-160、氨基酸 1-259、或氨基酸 1-269。在一个具体的实施方案中, 该融合蛋白缺乏人类钙黏着蛋白 -11 的前导序列和前体区域 (pro-region) (SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-53), 并且使用了一种异源性 (heterologous) 前导序列。该免疫球蛋白部分可以来自任何脊椎动物来源, 如鼠类, 但优选地是一种人类免疫球蛋白。在一个实施方案中, 该哺乳动物免疫球蛋白是一种人类 IgG₂ 蛋白或它的一部分, 例如人类 IgG₂ 的铰链 -CH₂-CH₃ 部分。

[0087] 本发明的一种嵌合的或融合的蛋白可以通过标准的重组 DNA 技术进行生产。例如, 对不同的蛋白序列 (例如, 一种 Cad-11EC1 结构域肽以及一种哺乳动物免疫球蛋白) 进行编码的 DNA 片段按照常规的技术一起进行框内连接在另一个实施方案中, 该融合基因可以通过多种常规技术 (包括自动化的 DNA 合成仪) 进行合成。可替代地, 可以使用锚定引物

进行核酸片段的 PCR 扩增,这些锚定引物在两个连续的核酸片段之间产生互补的突出端,这些核酸片段随后可以进行退火和再扩增从而产生一种嵌合的核酸序列(参见, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 1992)。此外,许多表达载体是可商购获得的,它们已经编码了一个融合部分(例如,一个 GST 部分、一个 Fc 部分)。可以将编码了蛋白 Cad-11 拮抗剂的一种核酸分子克隆到这种表达载体中,这样使得该融合部分(例如,免疫球蛋白)被框内连接至该蛋白上。

[0088] 本发明的免疫球蛋白融合蛋白可以作为单体、二聚体、四聚体、或其他多聚体(例如,聚合体)进行提供。例如,该融合蛋白的免疫球蛋白部分的可变域可以通过以下方式连接在一起以形成多价配体,例如在每个 V 结构域的 C 端提供一种绞链区以及在这些绞链区中的半胱氨酸之间提供二硫键;或提供多种重链,这些重链中的每一个在该结构域的 C 端上具有一个半胱氨酸,这些半胱氨酸由二硫键连接在一起;或产生 V-CH 和 V-CL 以产生一种 Fab 形式;或使用肽接头(例如, Gly₄Ser 接头)从而产生二聚体、三聚体、以及其他多聚体。例如,这类配体可以与一种抗体 Fc 区相连接,该 Fc 区域包括 CH2 和 CH3 结构域的一个或这两者、以及可任选的一个绞链区。例如,对多种配体进行编码的载体(作为一种单一的核苷酸序列与一个 Fc 区相连接)可以用于制备此类配体(例如,通过表达)。

[0089] 本发明的免疫球蛋白融合蛋白可以与其他部分相偶联,这些部分包括但不限于:聚乙二醇(PEG)的多聚体或它们的衍生物(例如,聚甲基乙二醇)、放射性核素、细胞毒性试剂和药物,并且随后用于体内治疗。放射性核素的例子除其他之外还包括包括:²¹²Bi、¹³¹I、¹⁸⁶Re、以及 ⁹⁰Y。这些放射性核素通过局部照射这些细胞来发挥它们的细胞毒性效应,导致不同的细胞内损害,正如放疗领域内所已知。可以与这些融合蛋白相偶联的细胞毒性药物包括但不限于:柔红霉素、阿霉素、甲氨蝶呤、以及丝裂霉素 C。细胞毒性药物类妨碍了关键的细胞加工,包括 DNA、RNA、以及蛋白质合成。对于这些类别的药物(它们在本领域内是已知的)、以及它们的作用机制的更加充分的展示,参见 Goodman, A. G., et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990, Katzung, ed., Basic and Clinical Pharmacology, Fifth Edition, p 768-769, 808-809, 896, Appleton and Lange, Norwalk, Conn.

[0090] 如在此所使用的,术语“免疫球蛋白融合蛋白”包括本发明的这些免疫球蛋白融合蛋白的片段。此类片段旨在本发明的范围内。例如,一旦这些分子被分离,可以用蛋白酶对它们进行切割从而产生仍然能够与人类 Cad-11 的 EC1 结构域相结合的片段。

[0091] 肽拮抗剂

[0092] 本发明的钙黏着蛋白 -11 拮抗剂还可以是与一种钙黏着蛋白 -11 蛋白的 EC1 结构域相结合的肽。这种肽可以包括任何适当的 L- 和 / 或 D- 氨基酸,例如常见的 α - 氨基酸(例如,丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸)、非- α - 氨基酸(例如, β - 丙氨酸、4- 氨基丁酸、6- 氨基己酸、肌氨酸、抑胃酶氨酸 (statine))、以及不常见的氨基酸(例如,瓜氨酸、同型瓜氨酸 (homocitrulline)、同型丝氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸)。在一种肽上的氨基、羧基和 / 或其他官能团可以是游离的(例如,未被修饰)或用一种适当的保护基团进行保护的。针对氨基基团和羧基基团的适当的保护基团、以及用于加入或去除保护基团的方法在本领域内是已知的,并且被披露于例如 Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1991。一种肽的官能团还可以使用领域已知的多种方

法进行衍生（例如，烷基化）。

[0093] 若希望，这种肽 Cad-11 拮抗剂可以包括一种或多种修改（例如，氨基酸接头、酰化作用、乙酰化作用、酰胺化作用、甲基化作用、末端修饰剂（例如，环化修饰作用））。这种肽还可以含有化学修饰作用（例如，N-甲基- α -氨基取代）。此外，这种肽拮抗剂可以是一种已知的和/或自然发生的肽的类似物，例如具有一种或多种保守的氨基酸残基取代的肽类似物。这些修饰可以改进这种肽的不同的特性（例如，溶解度、结合性），包括它的钙黏着蛋白-11 拮抗剂活性。

[0094] Cad-11 拮抗剂（它们是肽）可以是直链的、支链或环状的，例如具有一种杂原子环状结构（包括若干酰胺键）的肽。在一个具体的实施方案中，该肽是一种环肽。此类肽可以由本领域的普通技术人员使用标准的技术来进行产生。例如，一种肽可以通过酶促或化学切割从一种天然蛋白衍生或去除，或可以通过适当的方法进行合成，例如固相肽合成（例如，梅里菲尔德型合成 (Merrifield-type synthesis)（参见，例如 Bodanszky et al. “Peptide Synthesis,” John Wiley & Sons, Second Edition, 1976））。作为钙黏着蛋白-11 拮抗剂的肽还可以使用（例如）重组 DNA 方法学或其他适当的多种方法进行生产（参见，例如 Sambrook J. and Russell D.W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001）。

[0095] 这些肽可以被合成并且装配到文库种，这些文库包括少许至许多离散的分子种类。此类文库可以使用组合化学的方法户必须报告制备，并且可以使用任何适当的方法进行筛选以确定该文库是否包括具有一种令人希望的生物活性的肽。然后，可以使用适当的方法将此类肽拮抗剂分离。

[0096] 模拟肽拮抗剂

[0097] 钙黏着蛋白-11 拮抗剂还可以是模拟肽。例如，可以制备具有与肽类具有相同官能团的多糖。可以对多种模拟肽进行设计，这是（例如）通过在该环境中建立一种肽试剂的三维结构来进行的，其中该试剂结合到或将要结合到一种靶分子上。该模拟肽包括至少两种组分：这种或这些结合部分以及主链或支撑结构。

[0098] 这些结合部分是以下化学原子或基团，它们将与一种靶分子（例如，与 Cad-11 的 EC1 结构域中具有氨基酸）进行反应或与其形成一种复合物（例如，通过疏水性或离子相互作用）。例如，在一种模拟肽中这些结合部分可以与在一种肽或蛋白拮抗剂中的那些相同。这些结合部分可以是一种原子或化学基团，它与该受体按照与该肽拮抗剂中的结合部分相同或相似的方式进行反应。例如，计算化学可用于设计一种钙黏着蛋白-11 蛋白的 EC1 结构域的供体序列的肽模拟物，例如它可以与在 Cad-11 蛋白的 EC1 结构域中的口袋序列相结合。适合用于针对一种肽中的碱性氨基酸进行设计的模拟肽的结合部分的例子包括含氮基团，如胺类、铵类、胍类、以及酰胺类或磷鎓类。适合用于针对一种酸性氨基酸进行设计的模拟肽的结合部分的例子包括：例如羧基、低级烷基羧酸酯、磺酸、一种低级烷基磺酸酯、或亚磷酸或它的酯。

[0099] 该支撑结构是以下化学实体，该化学实体当这种或这些结合部分结合时提供了该模拟肽的三维构型。该支撑结构可以有机的或无机的。有机支撑结构的例子包括：多糖、聚合物、或有机合成的聚合物的寡聚体（如聚乙烯醇或聚丙烯交酯）。优选的是该支撑结构基

本上具有与该肽主链或支撑结构相同的大小和尺寸。这可以通过计算或测量这种肽和模拟肽的原子和键的大小而确定。在一个实施方案中,这种肽键的氮可以用氧或硫取代,例如形成一条聚酯主链。在另一个实施方案中,该羰基可以用一种磺酰基基团或亚磺酰基基团取代,从而形成一种聚酰胺(例如,一种聚磺酰胺)。可以制备这种肽的反向酰胺(例如,将一种或多种 $-\text{CONH}-$ 基团置换为一种 $-\text{NHCO}-$ 基团)。在又一个实施方案中,这种肽主链可以用一条聚硅烷主链取代。

[0100] 可以通过已知的方法来制造这些化合物。例如,一种聚酯模拟肽可以通过将一种羟基基团取代为在多种氨基酸上的对应的 α -氨基基团来进行制备,由此制备了一种羧酸,并且将这些羧酸顺序地酯化、可任选地将这种碱性和酸性侧链阻挡以使副反应最小化。确定一种适当的化学合成路线大体上很容易在确定该化学结构时进行鉴定。

[0101] 可以合成多种模拟肽并且将其装配到文库中,这些文库包括少许至许多离散的分子种类。可以使用熟知的组合化学方法来制备此类文库,并且可以对其进行筛选以确定该文库是否包括一种或多种模具有所希望的活性的拟肽。然后,可以通过适当的方法将此类模拟肽拮抗剂分离。

[0102] 小分子拮抗剂

[0103] 钙黏着蛋白-11 拮抗剂还可以是多种小分子。多种小分子的例子包括:有机化合物类,有机金属化合物类,无机化合物类,以及有机物的、有机金属化合物的或无机化合物的盐类。在一种小分子中的原子典型地通过共价的和/或离子键连接在一起。在一种小的有机分子中原子的安排可以表示一条链(例如,一条碳-碳链或一条碳-杂原子链)、或可以表示一种包含多个碳原子的环,例如苯或一种聚环的系统、或碳与多个杂原子的组合,即多个杂环,例如嘧啶或喹唑啉。尽管小分子可以具有任何分子量,它们大体上包括小于约 5,000 道尔顿的分子。例如,此类小分子可以是小于约 1000 道尔顿,并且优选是小于约 750 道尔顿、或更优选是小于约 500 道尔顿。多种小分子以及其他非肽性钙黏着蛋白-11 拮抗剂可以在自然界中发现(例如,识别的、分离的、纯化的)和/或合成产生的(例如,通过传统的有机合成、生物-介导的合成、或它们的一种组合)。参见,例如 Ganesan, Drug Discov. Today 7(1):47-55(2002 年 1 月);Lou, Drug Discov. Today, 6(24):1288-1294(2001 年 12 月)。自然发生的多种小分子的例子包括但不限于:激素类、神经递质类、核苷酸类、氨基酸类、糖类、脂质类、以及它们的衍生物。

[0104] 根据本发明的一种小分子钙黏着蛋白-11 拮抗剂以及它的生理学可接受的盐类可以抑制一种钙黏着蛋白-11 蛋白的同型结合(例如,通过直接与一种 Cad-11 的 EC1 结构域中的供体序列竞争结合到另一种钙黏着蛋白-11 的结合口袋上,通过直接与一种 Cad-11 蛋白的 EC1 结构域中的结合口袋竞争结合到另一种钙黏着蛋白-11 的供体序列上)。

[0105] 核酸拮抗剂

[0106] 本发明的 Cad-11 拮抗剂还可以是与一种人类钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域相结合的核酸分子(例如,寡核苷酸)。适当的核酸 Cad-11 拮抗剂包括适体类,它们能够以高亲和力和特异性通过除经典的沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对以外的交互作用结合到一种具体的感兴趣的分子上(例如,人类钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域)(Tuerk and Gold, Science 249:505(1990);Ellington and Szostak, Nature 346:818(1990))。

[0107] 适体类,与通过噬菌体展示或单克隆抗体(MAb)所产生的肽类一样能够特异性地

结合到选定的靶标上,并且通过结合、阻断它们的靶标发挥作用的能力。已经针对超过 100 种蛋白产生了由一种体外选择过程从随机序列寡核苷酸的集合体中生成的多种适体,这些蛋白包括生长因子类、转录因子类、酶类、免疫球蛋白类、以及受体类。一种典型的适体其大小为 10 至 15kDa (30 至 45 个核苷酸)、以亚纳摩尔的亲合力与其靶标相结合、并且与密切相关的靶标相区分(例如,将典型地不与来自相同基因家族的其他蛋白相结合)。一系列的结构性研究已经显示多种适体能够使用在抗体-抗原复合物中驱动亲和力和特异性的相同类型的结合相互作用(氢键、静电的互补性、疏水性接触、位阻排阻、等等)。

[0108] 与所感兴趣的一种靶标相结合的适体(例如,一种人类 Cad-11 蛋白的一种 EC1 结构域)可以使用一种被称为“通过指数富集对配体的系统进化”(SELEX)的标准方法而进行产生和鉴定,该方法说明于(例如)美国专利号 5,475,096 和美国专利号 5,270,163。

[0109] 钙黏着蛋白-11 拮抗剂的鉴定

[0110] 具有钙黏着蛋白-11 结合特异性的多种试剂(包括多种小分子)可以在一种筛选中进行鉴定,例如多种化学化合物和/或文库(例如,化学的、肽、核酸文库)的高通量筛选。

[0111] 特异性地结合到人类钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域上的多种抗体可以(例如)通过筛选可商购的组合抗体文库进行鉴定(Dyax Corp., MorphoSys AG)。筛选这些文库的多种适当的组合抗体文库和标准方法说明于 Hoet et al., Nature Biotechnology 23(3): 344-348 (2005) 以及 Rauchenberger et al., J. Biol. Chem. 278(40): 38194-38205 (2003), 通过引用将其内容结合在此。此类文库或多种分子的集合还可以使用熟知的化学方法进行制备。

[0112] 可替代地,特异性地结合到人类钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域上的多种鼠抗体可以(例如)通过用多种 EC1 蛋白结构域或 EC1 肽连同一种佐剂对小鼠进行免疫从而破坏对该抗原的耐受性来进行鉴定。可以对这些抗体筛选所希望的特异性和活性,并接着使用已知的技术使其人源化以产生用于治疗人类疾病的适当试剂。

[0113] 可以从许多可供使用的化学化合物文库中鉴定多种化合物或小分子,这些文库例如来自国家癌症研究所的化学资料档案库(the Chemical Repository of the National Cancer Institute)、以及分子文库小分子资料档案库(the Molecular Libraries Small Molecules Repository) (PubChem)、连同哈佛大学化学和细胞生物学研究所文库、以及可以从商业来源中获得的其他文库(例如 Chembridge, Peakdale, CEREP, MayBridge, Bionet)。此类文库或多种分子的集合还可以使用熟知的化学方法(例如,熟知的组合化学方法)进行制备。可以对这些文库进行筛选以鉴定结合并抑制钙黏着蛋白-11 的多种化合物。

[0114] 经鉴定的多种化合物可以充当前导化合物用于使用药物化学的多种熟知的方法来进行进一步多样化。例如,可以制备和筛选用于钙黏着蛋白-11 结合和/或抑制活性的多种化合物的集合(它们是该前导物的结构变体)。这可以导致将这些化合物的结构与生物活性联系起来的一种结构活性关系的开发。具有适当的结合和抑制活性的化合物可以被进一步开发用于体内用途。

[0115] 可以对于钙黏着蛋白-11 相结合的试剂进一步评价钙黏着蛋白-11 拮抗剂活性。例如,包括一种钙黏着蛋白-11 蛋白的组合物可用于一种筛选或结合测定,从而检测和/或

鉴定结合并拮抗该钙黏着蛋白-11 蛋白的多种试剂。适合使用的多种组合物包括,例如自然表达一种钙黏着蛋白-11 蛋白的细胞(例如,一种滑膜细胞)、此类细胞的提取物、以及重组钙黏着蛋白-11 蛋白。

[0116] 可以在一种竞争性结合测定中鉴定与一种钙黏着蛋白-11 蛋白相结合的试剂,例如其中评估了一种测试试剂抑制钙黏着蛋白-11 与一种参比试剂进行结合的能力。该参比试剂可以是一种全长 Cad-11 蛋白或它的包括该 EC1 结构域的一部分。该参比试剂可以用一种适当的标记物(例如,放射性同位素、表位标记物、亲和力标签(例如,生物素和抗生物素蛋白或链霉亲和素)、自旋标签、酶、荧光基团、化学发光基团、染料、金属(例如金、银)、磁珠)进行标记,并且可以确定在该测定中要求对该钙黏着蛋白-11 蛋白进行饱和的经标记的参比试剂的量值。在该钙黏着蛋白-11 蛋白与该测试试剂之间的复合物的形成的特异性可以使用一种适当的对照物(例如,未标记的试剂、单独的标签)进行确定。

[0117] 一种测试试剂抑制在该参比试剂与一种钙黏着蛋白-11 蛋白之间形成一种复合物的能力可以被确定为对于经标记的参比试剂的特异性结合的 50%抑制作用(IC_{50} 值)所要求的测试试剂的浓度。特异性结合被优选地定义为总结合(例如,在复合物中总标签)减去该非特异性结合。非特异性结合被优选地定义为在过量的未标记参比试剂存在下所形成的仍可在复合物中检出的标签的量值。在该方法中适合使用的参比试剂包括多种分子和化合物,它们特异性地结合到钙黏着蛋白-11 上,例如与钙黏着蛋白-11 相结合的抗体。

[0118] 拮抗一种钙黏着蛋白-11 蛋白的试剂可以通过对以下试剂进行筛选来鉴定,这些试剂具有一种拮抗(降低、防止、抑制)钙黏着蛋白-11 的一种或多种活性(例如像一种结合活性(例如,同型的 Cad-11 结合))的能力。此类活性可以使用一种适当的体外或体内测定来进行评估。对于钙黏着蛋白-11 活性的示例性测定之前已经进行了说明(Patel, SD, et al., Cell 124 : 1255-1268(2006); Lee et al., Science 315 : 1006-1010(2007))。

[0119] 一旦鉴定了一种钙黏着蛋白-11 拮抗剂,可以评估该钙黏着蛋白-11 拮抗剂在细胞中干扰(例如,降低、抑制、防止)与钙黏着蛋白-11 活性相关联的一种或多种生物学功能或特性的能力,这是例如使用一种基于细胞的、被设计成测量与钙黏着蛋白-11 相关联的一种具体的生物学功能或特性的测定来进行的。已知与钙黏着蛋白-11 表达和/或活性相关联的多种生物学功能和特性包括但不限于:细胞黏附、细胞迁移、细胞侵入、细胞分选、细胞凝聚、细胞重排、组织完整性和结构的维持、细胞增殖的接触抑制、以及多种癌(例如肿瘤)细胞的恶性转化(Kiener and Brenner, Arthritis Res Ther. 7(2) : 49-54(2005))。此外, Cad-11 拮抗剂在此被显示为抑制由多种滑膜细胞所产生的活性 MMP。用于评估钙黏着蛋白的一种或多种生物学功能的适当测定对于本领域的普通技术人员而言是已知的(参见,例如 Patel, SD, et al., Cell 124 : 1255-1268(2006)),并且包括例如在此说明的细胞聚集测定(见例证、材料和方法部分)。

[0120] 治疗的方法

[0121] 不希望被任何一种理论所束缚,据信 Cad-11 的 EC1 结构域的前大约 35 个氨基酸(例如,大约 33 至大约 37 个氨基酸)是同型的钙黏着蛋白结合所要求的,并且特异性地结合到 Cad-11 的这个区域的多种试剂可以有效地抑制在多个 Cad-11 分子之间的结合。因此,此类试剂在多种炎性关节障碍(例如,类风湿性关节炎)的治疗和预防方面是有用的,这些疾病与发炎关节中的滑膜细胞以及其他细胞类型中的 Cad-11 表达和活性相关联。因此,本

发明的一个方面涉及一种用于治疗哺乳动物受试者体内的炎性关节障碍的方法,包括对该受试者给予治疗有效量的一种 Cad-11 拮抗剂,该 Cad-11 拮抗剂结合到一种人类 Cad-11EC1 结构域肽 (SEQ ID NO :3) 上。

[0122] 使用本发明的这些方法,哺乳动物(例如,人)体内的炎性关节障碍可以通过给予一个量值的本发明的一种钙黏着蛋白-11 拮抗剂(例如,抗体类、融合蛋白类、小分子类、核酸类、肽类、模拟肽类)来进行治疗,该量值足以提供一种治疗益处,这是例如通过抑制细胞的聚集、或抑制细胞的迁移、或抑制由在一个可活动的关节中表达钙黏着蛋白-11 的细胞(例如,滑膜细胞)中所表达的活性蛋白酶或多种炎性分子来进行。

[0123] 因此,本发明的一个方面涉及一种用于治疗哺乳动物受试者体内的炎性关节障碍的方法,包括对该受试者给予本发明的治疗有效量的一种 Cad-11 拮抗剂。该炎性关节障碍可以是与一个可活动的关节的细胞(例如,滑膜细胞)中钙黏着蛋白-11 表达相关联、或以其为特征的任何障碍。可以由本发明治疗的多种炎性关节障碍的例子包括但不限于:类风湿性关节炎、银屑病关节炎、莱特尔氏综合征、以及强直性脊柱炎。在一种具体的实施方案中,该炎性关节障碍是类风湿性关节炎。

[0124] 在一个方面,治疗有效量的一种钙黏着蛋白-11 拮抗剂被给予需要它的患者。有待给药的钙黏着蛋白-11 拮抗剂的量值(例如,一种治疗有效量)可以由临床医生使用在此提供的指导及在本领域内的其他已知的方法来进行确定,并且取决于几种因素,包括例如所选定的具体试剂、该受试者的年龄、敏感性、对药物的耐受性、以及总体健康状况。例如,对于作为抗体的 Cad-11 拮抗剂的适当的剂量可以是每次治疗从大约 0.01mg/kg 至大约 300mg/kg 体重,并且优选每次治疗从大约 0.01mg/kg 至大约 100mg/kg、从大约 0.01mg/kg 至大约 10mg/kg、从大约 1mg/kg 至约 10mg/kg 体重。对于一种小分子 Cad-11 拮抗剂适当的剂量可以是每此治疗从大约 0.001mg/kg 至大约 100mg/kg、从大约 0.01mg/kg 至大约 100mg/kg、从大约 0.01mg/kg 至大约 10mg/kg、从大约 0.01mg/kg 至大约 1mg/kg 体重。对于作为蛋白或肽(直链的、环状的、模拟的)的钙黏着蛋白-11 拮抗剂的适当的剂量将导致该肽从大约 0.1 μ g/ml 至大约 200 μ g/ml 的血浆浓度。确定针对一种具体的试剂、患者以及癌症的剂量是完全在本领域中的普通技术人员的能力之内的。优选地,该剂量并未引起、或产生最小限度的不良副作用(例如,免疫原性应答、恶心、眩晕、胃部不适(gastric upset)、高粘稠度综合征、充血性心力衰竭、中风、肺水肿)。

[0125] 治疗有效量的一种钙黏着蛋白-11 拮抗剂可以被单独给药、或与一种或多种其他的治疗剂(例如,抗炎性剂)进行组合。用于治疗多种炎性关节障碍(特别是 RA)的适当的抗炎剂(它们可以与本发明的 Cad-11 拮抗剂相组合而进行给药)包括但不限于:(i) 非甾体抗炎药物(NSAID;例如,酮洛芬(detoprofen)、双氯芬酸、二氟尼柳、依托度酸、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、甲氯芬那酸(meclofenamate)、甲芬那酸、美洛昔康、萘丁美酮(nabumetone)、萘普生钠、奥沙普秦、吡罗昔康、舒林酸、托美丁、塞来考昔、罗非考昔、阿司匹林、水杨酸胆碱、双水杨酸酯(salsalte)、以及水杨酸钠和水杨酸镁);(ii) 类固醇类(例如,可的松、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙);(iii) DMARD,即缓解疾病的抗风湿性药物(例如,环孢霉素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、来氟米特、环磷酰胺、羟氯喹、柳氮磺吡啶、D-青霉胺、米诺环素、以及金);或(iv) 重组蛋白质类(例如, **ENBREL®**(依那西普,一种可溶的 TNF 受体)、**REMICADE®**(英利昔单

抗,一种嵌合的单克隆抗 TNF 抗体)、**ORENCIA®** (阿巴西普 (abatacept),一种可溶的 CTLA4 受体)、**ACTEMRA®** (妥珠单抗,针对 IL-6 受体的一种单克隆抗体)、以及 **RITUXAN®** (利妥昔单抗,针对 CD20 的一种单克隆抗体)。

[0126] 因此,一种钙黏着蛋白-11 拮抗剂可以作为一种联合治疗的部分(例如,与一种或多种其他治疗剂一起)进行给药。该 Cad-11 拮抗剂可以在一种或多种其他的治疗剂之前或同时被给药的。在一些实施方案中,该钙黏着蛋白-11 拮抗剂以及其他治疗剂可以作为单独的配制品或作为一种联合配制品被同时地(例如,共同地)进行共同给药。可替代地,这些试剂可以作为单独的组合物、在由有经验的临床医生所确定的一个适当的时间框(例如,足以允许这些疗法的药物效应的叠加的一段时间)之内进行顺序地给药。该钙黏着蛋白-11 拮抗剂以及一种或多种其他治疗剂能够以一种单一剂量或以多个剂量、以一种次序并且在适于达到一种令人希望的治疗效应(例如,关节炎症的减少和/或抑制)的时间表上进行给药。适当的剂量以及给药方案可以由临床医生来确定,并且取决于所选择的这种或这些试剂、药物配制品以及给药途径、不同的患者因素以及其他考虑。

[0127] 一种治疗效力(例如,关节炎症的减少或消除和/或关节炎症的防止或抑制)可以通过任何适当的方法(例如,成像(MRI、NMR))被确定。

[0128] 根据本发明的这些方法,将治疗有效量的一种 Cad-11 拮抗剂给予哺乳动物受试者以治疗一种炎性关节障碍。术语“哺乳动物受试者”在此被定义为包括多种哺乳动物:如灵长类动物(例如,人类)、牛、绵羊、山羊、马、犬、猫、兔子、豚鼠、大鼠、小鼠、或其他的牛、绵羊、马、犬科、猫科、啮齿动物以及鼠科物种。

[0129] 作为 Cad-11 拮抗剂的试剂可以由不同的途径给予哺乳动物受试者。例如,该试剂可以由任何适当的胃肠外的或非胃肠外的途径进行给药,包括例如局部的(例如,乳剂、软膏)、或鼻的(例如,溶液、悬浮液)。肠胃外给药可以包括例如:关节内、肌肉内、静脉内、心室内、动脉内、鞘内、皮下、或腹膜内的给药。该试剂还可以通过以下途径进行给药:口服(例如,以胶囊、悬浮液、片剂、或饮食)、经皮、真皮内、局部、通过吸入(例如,支气管内、鼻内、口服吸入或鼻内滴剂)、穿粘膜、或经直肠。给药在适当时可以是局部的或全身性的,并且若希望,可以同时使用超过一种途径。一种 Cad-11 拮抗剂的局部化给药可以通过关节内注射(例如,将该试剂直接注射到一个关节中)而实现。优选的给药模式可以根据所选择的具体试剂而发生变化。然而,全身性静脉内的或皮下的给药对于抗体是大体上优选的。

[0130] 递送还可以是通过注到患者的脑部或体腔内、或通过使用一种定时释放或持续释放的基质递送系统、或通过使用微粒、凝胶以及脂质体的原位递送。雾化装置、粉末吸入器、以及气溶胶化的溶液是代表性的方法,这些方法可以用于将此类制备品给予呼吸道。递送可以在体外、在体内、或离体。

[0131] 作为蛋白(例如,融合蛋白)的多种试剂可以是经由重组蛋白的体内表达来进行给药的。体内表达可以根据适当的方法、通过体细胞表达来实现(参见,例如美国专利号 5,399,346)。此外,还可以将该蛋白进行编码的一种核酸结合到逆转录病毒的、腺病毒的、或其他适当的载体种(优选的是,一种复制缺陷型感染性载体)用于递送,或可以将其引入到能够表达该蛋白的一种转染的或转化的宿主细胞中用于递送。在后者的实施方案中,可以将这些细胞以一个量值进行植入(单独或在一种阻挡装置中)、注射或以其他方式引入,该量值对于以一种治疗有效量表达该蛋白是有效的。

[0132] 基于核酸的钙黏着蛋白-11拮抗剂（例如，适体）能够以多种方式引入到所感兴趣的一种哺乳动物受试者中。例如，核酸可以从表达载体或PCR产物在宿主细胞中内源性表达，或被包装到合成的或工程化处理的组合物中（例如，脂质体、聚合体、纳米颗粒），然后这些组合物可以被直接引入到哺乳动物受试者的血流中（通过，例如，注射、输注）。抗钙黏着蛋白-11核酸或核酸表达载体（例如，逆转录病毒的、腺病毒的、腺相关的以及单纯性疱疹病毒的载体、工程化处理的载体、非病毒介导的载体）还可以使用已建立的基因治疗策略和科学试验计划而直接引入到哺乳动物受试者中（参见，例如 Tochilin V.P. Annu Rev Biomed Eng 8:343-375, 2006; Recombinant DNA and Gene Transfer, Office of Biotechnology Activities, National Institutes of Health Guidelines）。

[0133] 作为钙黏着蛋白-11拮抗剂的试剂（例如，小分子）可以作为一种药物的或生理学的组合物的一部分来给予哺乳动物受试者，例如作为包括一种钙黏着蛋白-11拮抗剂以及一种药学上可接受的载体的药物组合物的一部分。包括一种钙黏着蛋白-11拮抗剂的配制品或组合物，或包括一种钙黏着蛋白-11拮抗剂以及一种或多种其他治疗剂（例如，一种抗炎剂）的组合物将根据所选择的给药途径（例如，溶液、乳剂、或胶囊）而发生变化。适当的药用载体可以含有惰性成份，这些成分并未与这种钙黏着蛋白-11拮抗剂相互作用。可以采用多种标准的药物配制品技术，如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA 中所说明的那些方法。用于肠胃外给药的适当的药用载体包括，例如无菌水、生理盐水、抑菌盐水（含大约 0.9% mg/ml 苯甲醇的盐水）、磷酸盐缓冲盐水、Hank's 溶液、林格氏乳酸盐以及类似物。配制品还可以包括少量的物质，这些物质增强了该活性成分（例如，乳化剂、增溶剂、pH 缓冲剂、润湿剂）的效力。胶囊化组合物的方法（如，在硬明胶或环葡聚糖的包衣中）在本领域内是已知的。为了吸入，可以将该试剂溶解并且载入到一种适当的用于给药的分配器中（例如，一种雾化器或喷雾器或加压气溶胶分配器）。

[0134] 该药用试剂可以作为一种中性化合物或作为一种盐或酯来进行给药。药学上可接受的盐类包括与多种游离的氨基基团形成的那些盐，如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、或酒石酸的那些盐；以及与多种游离的羧基基团形成的那些盐，如衍生自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因、等等的那些盐。可以获得含有一种胺或其他碱性基团的化合物的盐类，这是例如通过与一种适当的有机酸或无机酸（如，氯化氢、溴化氢、乙酸、高氯酸以及类似物）反应来进行的。具有一种季铵基团的化合物还包含一种反阴离子，如氯离子、溴离子、碘离子、醋酸根、高氯酸根以及类似物。包含一种羧酸或其他酸性官能团的化合物的盐类可以通过与一种适当的碱（例如，一种氢氧化物碱）反应来制备。酸性官能团的盐类包含一种反阳离子，如钠离子或钾离子。

[0135] 本发明现在将通过以下实例进行说明，这些实例并非旨在以任何方式进行限制。

[0136] 例证

[0137] 实例 1：具有针对人类钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域的 N 端 35 个氨基酸内一种表位的结合特异性的 Fab 的鉴定。

[0138] 材料和方法

[0139] 蛋白质印迹法

[0140] 通过 SDS-PAGE 将多种蛋白分离,并且使用标准方法将它们转移到硝酸纤维素 (NC) 膜上。简言之,用 Tris 缓冲的 - 盐水 - 吐温 (TBST) (8.8g/L 的 NaCl、0.2g/L 的 KCl、3g/L 的 Tris 碱、500ul/L 的 Tween-20、pH 至 7.4) 漂洗 NC 膜。将该膜用溶解于 TBST 中的 4% BSA 在 22℃ 下封闭 1 小时。将该 NC 膜用 TBST 漂洗 3 次,每次 5 分钟。将小鼠抗人 Cad-11 抗体在 TBST 中稀释至 0.5 μ g/ml,并且在 22℃ 下将该 NC 膜孵育达 1 小时。将该 NC 膜用 TBST 漂洗 3 次,每次 5 分钟。将偶联着辣根过氧化物酶 (HRP) 的山羊抗小鼠 Ig 抗体在 TBST 中稀释至 1 μ g/ml,并且在 22℃ 下在室温 (RT) 下将该 NC 膜在第二溶液中孵育最短 1 小时。将该 NC 膜在 TBST 中漂洗 3 次,每次 5 分钟。使用标准 HRP 方法使信号显色。

[0141] ELISA

[0142] 将该抗原 (5 μ g/ml 或 50 μ g 的 Cad-11-EC1-Fc 或 5 μ g/ml 的钙黏着蛋白肽) 在一种缓冲液中稀释并且将其用于在 4℃ 下对这些板包被过夜。将这些板洗涤并且用 1.5% BSA、5% 低脂奶粉 (处于 PBS 稀释缓冲液中:5% BSA、2.5% 低脂奶粉、0.1% Tween-20,在 PBS 中) 封闭。然后,将这些板用包含该抗 Cad-11 人 fAb 或纯化的抗 Cad-11 人 fAb 的细菌裂解液孵育达 1 小时。洗涤之后,将二抗 (Cy5- 偶联的一种人 Fab, 1/100 稀释) 施用达 25 分钟。然后,洗涤这些板,并接着读取得到的荧光。

[0143] 结果

[0144] 对三组之前报道的钙黏着蛋白 -11- 特异性抗体测试与人类钙黏着蛋白 -11 的 EC1 结构域相结合的能力。这些抗体包括:对抗钙黏着蛋白 -11 敲除或缺陷的小鼠中的一种小鼠钙黏着蛋白 -11-Fc 融合蛋白免疫原所产生的抗体 (Lee et al., Science 315: 1006-1010 (2007)), 在钙黏着蛋白 -11 野生型小鼠中产生的抗体,这些抗体对抗已经在 CHO 细胞中产生的一种人类钙黏着蛋白 -11-Fc 融合蛋白免疫原 (Valencia et al., J Exp. Med. 200 (12): 1673-1679 (2004)), 以及在钙黏着蛋白 -11 野生型小鼠中产生的抗体,这些抗体对抗包含人类钙黏着蛋白 -11 的 EC1-3 结构域的一种通过细菌产生的蛋白。通过蛋白质分析对这些抗体测试了结合融合蛋白的能力,这些融合蛋白仅包含人类 Cad-11 的 EC1 结构域 (钙黏着蛋白 -11-EC1-Fc)、Cad-11 的 EC1 以及 EC2 结构域 (Cad11-EC1/2-Fc)、或 Cad-11 的所有 5 个 EC 结构域 (钙黏着蛋白 -11-EC1-5-Fc)。在蛋白质印迹上,所测试的这些抗体都没有识别 EC1-Fc 或 EC1-2-Fc 融合蛋白 (图 1A)。然而,来自所测试的三组中每一组的抗体识别了包括胞外域 1 至 5 的人类 Cad-11-Fc 融合蛋白 (图 1B)。这些结果表明所测试的这些抗体并不结合人类 Cad-11 的 EC1 或 EC2 结构域,但却识别在这种蛋白的胞外区中其他地方的多种表位。

[0145] 可以获得的已公布的抗 Cad11 抗体 (这些抗体结合了表达 Cad11 的细胞): 13C2、23C6、5F82 (Lifespan Science) 以及 283416 (R&D Systems)、连同 Cad11EC1- 结合抗体 H1M1、以及对照抗体 MOPC 是通过 ELISA 针对与以下融合蛋白相结合的能力进行测试,这些融合蛋白仅包含人类 Cad-11 的 EC1 结构域 (钙黏着蛋白 -11-EC1-Fc) 或 Cad-11 的所有 5 种 EC 结构域 (钙黏着蛋白 -11-EC1-5-Fc)。所测试的可以获得的已公布的抗 Cad11 抗体都没有识别 EC1-Fc (图 1B, 空心柱) (在此没有显示对于 283416 的数据)。然而, Cad11EC1 结合的 H1M1 抗体结合了钙黏着蛋白 -11-EC1-Fc 以及钙黏着蛋白 -11-EC1-5-Fc 这两者 (图 1B 实心柱)。对照 MOPC 抗体对两种融合蛋白均不结合。这些结果表明这些可以获得的已公布的抗 Cad11 抗体没有与人类 Cad-11 的 EC1 结构域相结合,但却在这种蛋白的胞外区中

的其他地方识别了多种表位。

[0146] 为了产生对人类钙黏着蛋白-11的EC1结构域的N端35个氨基酸之内的一种表位具有特异性的抗体,对编码了人类Fab的噬菌体展示文库(MorphoSys AG)进行筛选。使用两个选择指标对候选的Fab进行鉴定:针对与一种肽(该多肽包括人类钙黏着蛋白-11EC1结构域的前35个氨基酸)相结合的一种阳性选择,以及针对与相应肽(来自两个密切相关的并且高度同源的钙黏着蛋白(钙黏着蛋白-8和MN-钙黏着蛋白)的EC1结构域)相结合的一种阴性选择(图2)。使用ELISA来评估结合。

[0147] 进行两种筛选。在第一种筛选中,通过ELISA对结合钙黏着蛋白-11EC1肽的96种Fab克隆进行鉴定。七(7)种候选的Fab结合了Cad-11EC-1肽;然而,这些Fab中仅有两种与EC-1肽以及EC1-2-Fc融合蛋白这二者相结合。这两种Fab之一还与MN-Cad肽相结合。因此,这7种Fab克隆中仅有一种特异性地结合到EC1-Fc融合蛋白上,但不结合到MN-Cad以及钙黏着蛋白-8EC1结构域肽这两者上。在第二筛选中,观察到了相似的结果,因为96种Fab中仅有1种(克隆F9)显示对于钙黏着蛋白-11EC1肽和EC1-2-Fc融合蛋白的特异性,不能结合到MN-Cad和钙黏着蛋白-8EC1结构域肽上(图3)。所测试的结合Cad-11EC1结构域的Fab中的大多数显示出与MN-Cad肽的交叉反应性,这种肽含有与Cad-11的EEY CAR序列重叠的EEY CAR序列。

[0148] 实例2:与钙黏着蛋白-11的EC1结构域相结合的Fab在体外测定中抑制了Cad-11介导的细胞聚集

[0149] 材料和方法

[0150] 体外钙黏着蛋白-11聚集测定

[0151] 431-D细胞悬浮生长并且在正常情况下不表达任何钙黏附蛋白并且不聚集。已经将431-D-11细胞进行遗传修饰以表达Cad-11。431-D-11细胞在培养基中单独孵育,并且它们开始聚集超过40分钟,并且这些细胞簇沉积在孔的底部,并且可以测量剩余的未聚集的、处于悬浮状态的细胞,并且计算聚集的431-D-11的百分数。对于这项聚集测定,431-d-11细胞(D-11细胞)在烧瓶中生长至亚会合状态,并接着使用0.05%胰蛋白酶加上0.53mM EDTA将其从该烧瓶移出。将大约 2×10^6 个431-D-11细胞加到2ml的SME培养基中(Dulbecco's Modified Eagle's 高葡萄糖培养基、0.1M HEPES、pH7.4、以及5U/ml DNA酶),并且在一种测试试剂(例如,抗体、Fab、融合蛋白)不存在或存在时在冰上将其预孵化15分钟。在与该测试试剂预孵化之后,将这些细胞转移至24-孔板上的一种圆底孔中并且在37°C下进行孵育,同时在旋转摇床上以130rpm进行旋转。当细胞聚集时,它们沉到该孔的底部。在0分钟和40分钟时,从该孔中、从该样品的中央去除200 μ l并且将其与25 μ l的8%戊二醛进行混合以固定这些细胞。将200 μ l的所固定的细胞样品加入到9.8ml的库尔特粒度仪等渗盐水溶液中,并且使用设置在8 μ m至24 μ m阈值的库尔特粒度仪进行计数。每个样品记录了3次细胞计数。计算了与在0分钟时间点相比在40分钟时间点时细胞减少或聚集细胞的百分比。

[0152] 结果

[0153] 具有对于在钙黏着蛋白-11EC1结构域的N端35个氨基酸之内的一种表位的结合特异性的候选Fab(克隆F9)(它不与MN-Cad或Cad-8的EC1结构域相结合),是使用一种体外钙黏着蛋白-11细胞的聚集测定对于抑制Cad-11介导的细胞聚集的能力进行测试。

该候选的 Fab 在 $1\mu\text{g/ml}$ 或更低的浓度下显著地抑制了钙黏着蛋白-11 介导的细胞聚集。(图 4 和 5)。相比之下,由 13C2 抗体(它结合到 EC1/2 结构域之外的 Cad-11 胞外区中的一种表位上)制备的 Fab 仅仅在 $10\mu\text{g/ml}$ 的浓度下就抑制了钙黏着蛋白-11 的聚集,这提示 F9Fab 与结合到 Cad-11 胞外域的其他部分上的多种抗体相比以更低的浓度更加有效地抑制了 Cad-11 活性。

[0154] Cad-11 介导的细胞聚集也被不同的抗-钙黏着蛋白-11EC1 结构域 Fab 抑制,这些 Fab 对于单独的 Cad-11、Cad-11 与 Cad-8、Cad-11 与 MN-Cad、或 Cad-11、Cad-8 与 MN-Cad 是特异的(图 6 和 7)。相对于这些对照样品(例如, SME 培养基)(图 6)、对 GFP 特异的一种 Fab(图 7),所测试的所有钙黏着蛋白-EC1-结构域特异性 Fab 都在体外抑制了细胞的聚集。

[0155] 实例 3:包含人类钙黏着蛋白-11 的 EC1 结构域的钙黏着蛋白-11/免疫球蛋白融合蛋白的产生。

[0156] 这种钙黏着蛋白-11EC1 区是从一种载体制备的,该载体编码了全长人类钙黏着蛋白-11cDNA(将人类 Cad-11 克隆到 **Invitrogen pCEP4**[®]载体的 Not1 和 Kpn-1 位点),这是在标准条件下使用聚合酶链式反应(PCR)进行的,使用 1 以下寡核苷酸引物从而将 EcoR1 和 Bgl1II 位点(参见,对应地在正向和反向引物中的下划线序列)引入到所扩增的产物中:正向引物:

[0157] Ttttttttttgaattcatgaaggagaactactgtttacaagc (SEQ ID NO :8)

[0158] EcoR1

[0159] 反向引物:

[0160] Ttttttttttagatctcttgaccttgacaatgaattccgacgg (SEQ ID NO :9)

[0161] Bgl1II

[0162] 用限制性内切酶 EcoR1 和 Bgl1II 将所扩增的产物消化,并且将这种消化产物分离并且使用对应的 EcoR1 和 Bgl1II 位点将其连接到 pFUSE-hIgG2e1-Fc1 载体中(InvivoGen)。按照制造商所说明的用这种连接产物将 TOP10 感受态细菌(Invitrogen)转化,并且用新霉素(zeomycin)选择具有钙黏着蛋白-11-EC1-Fc 质粒的细菌。将钙黏着蛋白-11-EC1-Fc 质粒分离、测序、并接着用于瞬时转染 293F 细胞。收集条件培养基,并且使用切向流过滤之后跟随在 50/50 混合的 A/蛋白 G 柱(在 20mM HEPES、pH7.4、137mM NaCl、3mM KCl、以及 1mM CaCl_2 中平衡)上分离而将钙黏着蛋白-11-EC1-Fc 融合蛋白(SEQ ID NO :9)纯化。使用 0.1M 甘氨酸(pH 3)和 1mM CaCl_2 将纯化的钙黏着蛋白-11-EC1-Fc 融合蛋白从该柱子中洗脱,并且进入包含 200 μl 的 1M Tris、pH7.4、以及 1mM CaCl_2 的管中。然后,将这些具有 Cad-11 融合蛋白的洗脱液对 20mM Hepes(pH7.4)、137mM NaCl、3mM KCl、以及 1mM CaCl_2 进行透析。通过 SDS PAGE 证实了这种蛋白的大小(图 10),并且使用识别这种人类 Fc 区域的抗体通过蛋白质印迹分析以及对 N 端进行测序(未显示)证实了身份(图 11)。使用与如上说明的那些相似的技术和条件产生 Cad-11-EC1-2-Fc。

[0163] 实例 4: Cad-11-EC1-Fc 免疫球蛋白融合蛋白在体外测定中抑制了 Cad-11 介导的细胞聚集

[0164] 材料和方法

[0165] 细胞侵入/迁移到基质胶塞中

[0166] 在 FLS 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's 高葡萄糖培养基 [Sigma#D7777]、10 % 胎牛血清 [Benchmark#100-106]、1 % 青霉素 (Pencillin)-链霉素 [Gibco 315140-122]、1% L-谷氨酰胺 [Gibco#25030]、0.5% 庆大霉素 [Gibco#15710-064]) 中在基质胶 ECM 包被的转移孔 (transwell) 中评定了 FLS 的迁移活性。将在包含 1×10^4 个细胞的 FLS 培养基中的人类 FLS 细胞悬液加入到设置在 24 孔板的孔中的对照插入物或基质胶包被的插入物中, 该 24-孔板含有 0.750mL 的 FLS 培养基。然后, 将这些板在 37°C 下、5% CO₂ 大气压下、在一种增湿的组织培养孵育器中孵育达 22 个小时。

[0167] 为了计算迁移的细胞的数目, 通过用棉签擦拭将非侵入性细胞从对照插入物的膜的上表面移出。使用由 FLS 培养基沾湿的棉签重复第二次 擦拭。然后, 将对照插入物固定, 并且使用分化染色试剂盒 [Fisher#122-911] 进行染色。插入物允许被干燥, 并且使用具有 10x 物镜的显微镜在该对照插入物的 4 个象限中对细胞进行计数。对插入物进行计数, 重复三次, 并且将总数进行平均。

[0168] 为了计算侵袭这些基质胶插入物的细胞的数目, 通过用棉签进行擦拭将非侵入性细胞从该基质胶插入物的表面轻轻地去。使用由 FLS 培养基沾湿的棉拭重复进行第二次 擦拭。然后, 将插入物固定, 并且使用分化染色试剂盒 [Fisher#122-911] 进行染色。插入物允许被干燥, 并且使用具有 10x 物镜的显微镜在该对照插入物的 4 个象限中对细胞进行计数。对插入物进行计数, 重复三次, 并且将总数进行平均。

[0169] 结果

[0170] Cad-11-EC1-Fc 在 3 μ g/ml 的浓度下显著地抑制了细胞的聚集, 而包含人类 Cad-11 的全部 5 个 EC 结构域的全长 Cad-11-EC1-5-Fc 蛋白在 100 μ g/ml 的浓度下抑制了 Cad-11 介导的聚集 (图 13)。这些数据显示 Cad-11-EC1-Fc 免疫球蛋白融合蛋白在体外测定中有效地抑制了 Cad-11 介导的细胞聚集。

[0171] 此外, 体外测试了 Cad-11-EC1-Fc 免疫球蛋白融合蛋白抑制人类成纤维细胞样滑膜细胞 (FLS) 侵入基质胶塞的能力。FLS 侵入到基质胶中是一种复杂的过程, 该过程涉及由 FLS 表达的 MMP1、MMP-3、MMP-13、丝氨酸蛋白酶、及其他蛋白以降解该基质胶连同 FLS 迁移到基质胶中。在一种分开的测定中, 我们没有看见对 FLSA 迁移通过正常纤维插入物的抑制。这提示这种 EC-Fc 或 13C2 单克隆抗体的作用是抑制该基质胶 (一种关节软骨的代用品) 的降解。在两个独立的实验中, Cad-11-EC1-Fc 以及鼠抗 Cad-11 单克隆抗体 13C2 这两者均抑制了 FLS 侵入到基质胶塞中。

[0172] 实例 5: 对抗人类钙黏着蛋白 -11 的一种 EC1 结构域肽的抗体的产生。

[0173] 材料和方法

[0174] 用 0.01mg 的一种肽在足垫处对 Balb/c 小鼠进行免疫, 每周两次 (bi-weekly), 一个月 9 次, 这种肽与人类 Cad-11EC1 结构域的前 33 个氨基酸 (GWVWN QFFVI EEYTG PDPVL VGRLH SDIDS GDG (SEQID NO:10)) 相对应, 以共价键与 BSA 连接。这种肽在此被称为肽 4。从经免疫的小鼠得到脾, 并且将其与一种鼠融合伴侣 P3X63-Ag8.653 进行融合, 从而生成产生抗体的杂交瘤。以 10、3 或 0.1 个 5 细胞 / 孔将这些杂交瘤扩展并且亚克隆, 并且在 ELISA 中对来自这些杂交瘤的、含有抗 Cad-11 抗体的培养基筛选与在细菌中产生的、包含 Cad-11EC1-2 结构域的蛋白特异性地结合的能力。同时, 对来自这些肽 4 杂交瘤的、包含抗 -Cad-11 抗体的培养基筛选与涵盖人类 Cad-8 和 MN- 钙黏着蛋白的 EC1-2 结构域的蛋

白相结合的缺失。在 4℃下用 0.05ml 的 0.0 至 0.3mg/ml 的 EC1-2Cad 蛋白中的每一种将 96-孔 EIA 板包被过夜,并接着用盐水缓冲液洗涤若干次。然后,用 0.25ml 的酪蛋白-PBS 缓冲液封闭这些板,并且用盐水缓冲液洗涤若干次。在 22℃下将包含这种抗 Cad-11 抗体的杂交瘤培养基在每个孔中进行未稀释地孵育达 1 小时,并接着用 PBS-Tween(0.05%)洗涤两次。将 100 μl 的一种羊抗小鼠 IgG 二抗的 1/1000 稀释液加入到每个孔中,在 22℃下孵育 30 分钟,并接着用 PBS-Tween(0.05%)洗涤两次。将 100 μl/孔的室温 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)试剂加入到每个孔中,并且允许在 22℃下显色 5 分钟。用 100 μl 的室温的 2N 硫酸将该反应终止,并且在 Wallac 1420 酶标仪上在 450nm 下读取该板。

[0175] 使用 ELISA 进一步测试了 H1M1 和 H14 抗 Cad-11 抗体对抗 Cad-11、Cad-7、Cad-8、Cad-20、Cad-24、Cad-9、Cad-18、以及 MN-Cad 的 EC1 结构域的前 33 个氨基酸的特异性。合成了与 Cad-7、Cad-8、Cad-20、Cad-24、Cad-9、Cad-18、MN-Cad 的区域(该区域与 Cad-11EC1 结构域的 G1-G33 区域重叠)相对应的肽,并且将这些肽与生物素相偶联。将 100 μl 的这些肽中每一种的在 PBS-Tween 中(0.05%)的 30ng/ml 溶液在 4℃下在 96-孔 Netravadin 板的每个孔中孵育 2-3 小时,并接着用 PBS-Tween(0.05%)洗涤两次。在 22℃下将不同浓度的抗 Cad-11 抗体在每个孔中孵育 1 小时,并接着用 PBS-Tween(0.05%)洗涤两次。将 100 μl 的一种羊抗小鼠 IgG 二抗的 1/1000 稀释液加入到每个孔中,在 22℃下孵育 30 分钟,并接着用 PBS-Tween(0.05%)洗涤两次。将 100 μl/孔的室温 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)试剂加入到每个孔中,并且允许在 22℃下显色 5 分钟。用 100 μl 的室温的 2N 硫酸将该反应终止,并且在 Wallac 1420 酶标仪上在 450nm 下读取该板。

[0176] 对来自含有阳性抗 Cad-11 抗体杂交瘤的多个孔的培养基测试与 Cad-11 表达细胞相结合的能力。使冰冻的表达 Cad-11 的 431D 细胞解冻,并且在 Hanks 平衡盐水溶液(HBSS)中洗涤两次,这种 HBSS 含有 Ca^{2+} (0.137M NaCl、5.4mM、KCl 0.25mM Na_2HPO_4 、0.44mM KH_2PO_4 、1.3mM CaCl_2 、1.0mM MgSO_4 、以及 4.2mM NaHCO_3),并接着在含有 Ca^{2+} 的 HBSS 中以 10^6 个细胞/ml 进行重悬。用 50%或 16%的抗 Cad-11 抗体培养基在冰上将 10^5 个细胞/孔染色 45 分钟,在含有 Ca^{2+} 的 HBSS 中洗涤两次,用一种与藻红蛋白(phytoerytherin)相偶联的羊抗鼠 IgG 二抗(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)以 1%的浓度在冰上染色 45 分钟,并接着在含有 Ca^{2+} 的 HBSS 中再洗涤两次。然后,在含有 Ca^{2+} 和 1%甲醛的 400 μl HBSS 中将这些细胞重悬,并且随后在 FACScalibur(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)上对于 PE 阳性细胞进行分析。

[0177] 结果

[0178] 来自这些肽 4 杂交瘤的、包含抗 -Cad-11 抗体的培养基与 Cad-11EC1-2 蛋白相结合(图 16,HL 对比 Cad11),但不结合包含 Cad-8 和 MN-Cad 的 EC1-2 结构域的蛋白(图 16,对应地为 HL 对比 Cad8 以及 HL 对比 MNCAD)。对照杂交瘤培养基不与所测试的钙黏着蛋白中的任何相结合(图 16,Media 对比 CAD11、Media 对比 CAD8、以及 Media 对比 MNCAD)。这些数据证明了在这些杂交瘤中存在针对肽 4 的 Cad-11 特异性抗体。

[0179] 两种肽 4 杂交瘤(在此被称为 H1M1 和 H14)与表达人类 Cad-11 蛋白的细胞相结合(图 17A 至 C 和 17G 至 I),但不与非 Cad-11 对照 431-D 细胞相结合(图 17D 至 17F)。被称为 H1M1 的杂交瘤细胞系具有 A. T. C. C. 命名号 PTA-9699,已经于 2009 年 1 月 8 日保存。被称为 H14 的杂交瘤细胞系具有 A. T. C. C. 命名号 PTA-9701,已经于 2009 年 1 月 9 日保存。

这些杂交瘤包含体外识别肽 4 以及表达 Cad-11 的细胞的抗 Cad-11 抗体。这些抗体与表达 Cad-11- 的细胞的结合是用所使用的肽 4 抗体的量进行滴定来显示的,正如在 H1M1 的滴定 (图 18A) 和 H14 的滴定 (图 18B) 对比来自平均荧光强度 (MFI) 的细胞染色强度的曲线图所示。

[0180] 与所测试的任何其他钙黏着蛋白 (它们包括 Cad-7、Cad-8、Cad-20、Cad-24、Cad-9、Cad-18、以及 MN-Cad) 相比,H1M1 和 H14 肽 4 抗 -Cad-11 抗体证明了与 Cad-11 相结合高出超过 100 倍。在大多数情况下,没有观察到 H1M1 和 H14 抗 Cad-11 抗体与其他钙黏着蛋白的结合。抗 Cad-11 抗体 H14 显示出对 Cad-11 的强结合 (图 19A),对 Cad-8 的结合低 468 倍 (图 19A),并且几乎不结合 Cad-7、MN-Cad、Cad-9、Cad-18、Cad-20、或 Cad-24 (图 19B)。类似的,抗 Cad-11 抗体 H1M1 显示出对 Cad-11 的强结合 (图 20),对 Cad-8 的结合低 365 倍 (图 20),并且不结合 Cad-7、MN-Cad、Cad-9、Cad-18、Cad-20、或 Cad-24 (数据未显示)。

[0181] 实例 6:这些抗 Cad-11EC1 结构域抗体 H1M1 和 H14 与包括氨基酸序列 GPDP 的 Cad-11EC1 结构域中的表位相结合。

[0182] 材料和方法

[0183] 为了确定在肽 4Cad-11EC1 抗体 H1M1 和 H14 所结合的 Cad-11EC1 结构域内的表位,将跨越 EC1 区域的前 37 个氨基酸的 4 种不同的肽 (见图 22) 以一种 ELISA 形式进行固定,并且确定了 H1M1 和 H14 抗体与这 4 种肽中的每一种相结合的能力。在 4℃ 下用 0.3ng/ 孔的肽 1 (Cad-11EC1 结构域的氨基酸 G1-P18)、0.3ng/ 孔的肽 2 (Cad-11EC1 结构域的氨基酸 G15-N34)、0.3ng/ 孔的肽 3 (Cad-11EC1 结构域的氨基酸 V19-Y37)、0.3ng/ 孔的免疫原肽 4 (Cad-11EC1 结构域的氨基酸 G1-G33)、20ng 的一种融合蛋白 (包括整个 EC1 结构域 (EFL))、或 20ng 的对照人类 Ig (Fc- 段) 将 96- 孔再反应结合板包被过夜。将这些孔用 PBS-Tween (0.05%) 洗涤两次、在 22℃ 下用在 dH₂O 中的酪蛋白封闭 3 小时,并接着用 PBS-Tween (0.05%) 再次洗涤两次。将不同稀释的这些不同的肽 4CAD-11EC1 结构域抗体转移到这些肽或蛋白包被的孔中,在 22℃ 下孵育 45 分钟,并接着用 PBS-Tween (0.05%) 洗涤两次。将 100 μl 的羊抗小鼠 IgG 二抗 (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA) 的 1/1000 稀释液加入到每个孔中,在 22℃ 下孵育 30 分钟,并接着用 PBS-Tween (0.05%) 洗涤两次。将 100 μl/ 孔的室温 TMB 试剂加入到每个孔,并且允许在 22℃ 下显色 5 分钟。用 100 μl 的室温的 2N 硫酸将该反应终止,并且在 Wallac 1420 酶标仪上在 450nm 的波长下读取该板。

[0184] 结果

[0185] 在该 ELISA 中,肽 4 抗 -Cad-11 抗体 H1M1 在 1 : 11 下 (图 21A) 并且 H14 在 1 : 23 下 (图 21B) 均与肽 4 (PEP4) 免疫原、连同 EC1 结构域融合蛋白 (EFL) 相结合,正如通过相对于对照物提高的 OD₄₅₀ 孔板读数所指示。这些抗体中没有一种与这种人类 IgG 对照 (Fc 段) 相结合。此外,在该 ELISA 中这两种抗体均与肽 2 (PEP2) 相结合,但不结合肽 1 (PEP1) 或肽 3 (PEP3) (图 21A 和 21B)。

[0186] 这些结果提示这些抗 Cad-11EC1 结构域抗体 (H1M1 和 H14) 与一种常见表位 (common epitope) 相结合,该表位在肽 2 和 4 中、但不存在于重叠的肽 3 中。作为肽 3 的上游、由肽 2 和 4 共有的氨基酸在图 22 所示的加框区域中被突出显示。从 Cad-11EC1 结构域

的 G15 开始,这四个氨基酸 GPDP (SEQ ID NO :11) 可能是由 H1M1 和 H14 抗体所识别的表位的一部分。

[0187] 实例 7 :抗 Cad-11EC1 结构域抗体 H1M1 和 H14 体外抑制了表达 Cad-11 的细胞的聚集。

[0188] 材料和方法

[0189] 为了评估这些 Cad-11 抗体抑制 Cad-11 介导的细胞聚集的能力,将 30 μ g/ml 的 H1M1 肽 4 抗体与 75,000 个表达 Cad-11 的 A-431-D 表皮样癌细胞在 24-孔圆底聚丙烯板中、在 0.5ml 的 DMEM-高葡萄糖、20mMHepes pH 7.4、10% FCS、以及 10U/ml DNA 酶中培养。将这些 24-孔板放置在旋转的平台上(以大约 60rpm),并且在 37°C 下用 5% CO₂ 孵育过夜。第二天,在 100x(对于 H1M1 实验)或 40x(对于 H14 实验)放大倍数下对这些板拍照之后评定细胞的聚集。

[0190] 结果

[0191] 在对照同种型抗体 (30 μ g/ml) 的存在下,这些表达 Cad-11 的细胞形成了大块(图 23A),而这些亲本的 Cad-11 阴性细胞保持着单细胞群或双细胞群(图 23C)。这些 H1M1 处理的 Cad-11 细胞保持为小的细胞簇(图 23B),这些细胞簇没有发展形成使用该对照抗体所获得的大的团块。

[0192] 使用相同的测定,抗 Cad-11 抗体 H14 还显示出抑制 Cad-11-介导的聚集。尽管这些亲本的表达 Cad-11 的细胞形成了大的聚集的细胞簇(图 24A),这种 H14 抗体(图 24B)在 30 μ g/ml 的浓度下抑制了聚集,因为细胞簇是小的并且稀少的。这些结果表明这些抗 Cad-11 抗体(H1M1 和 H14)在体外抑制了 Cad-11 介导的细胞聚集。

[0193] 实例 8 :抗 Cad-11EC1 结构域抗体 (H1M1 和 H14) 在类风湿性关节炎的鼠模型中在体内抑制与关节炎相关联的关节肿胀。

[0194] 材料和方法

[0195] 研究 1- 在第 0 天和第 2 天用 150 μ l 的 KBN 血清注射六周龄的雄性 C57/B16 小鼠。经 KBN 血清处理的小鼠接受了盐水注射液(图 25,空心的三角形)或用不同剂量的 H1M1 抗 -Cad-11EC1 抗体进行治疗。治疗方案包括:在第 0 天用 0.5mg 的抗体 / 小鼠进行给药,并且在这之后每隔一天 (q2d) 用 0.1mg 的抗体 / 小鼠 (0.5mg+0.1mg) 进行给药(图 25,实心三角形);在第 0 天用 0.5mg 的抗体 / 小鼠 (0.5mg) 进行给药(图 25,菱形);每隔一天 (q2d) 用 0.1mg 的抗体 / 小鼠 (0.1mg+0.1mg) 进行给药(图 25,正方形);或每隔一天 (q2d) 用 0.3mg 的抗体 / 小鼠 (0.3mg+0.3mg) 进行给药(图 25,圆形)。对照组由 5 只小鼠组成,并且治疗组由 7 只小鼠组成。与关节炎相关联的关节肿胀是通过每隔一天采取的卡尺测量来确定的。

[0196] 研究 2- 在第 0 天和第 2 天用 150 μ l 的 KBN 血清注射六周龄的雄性 C57/B16 小鼠,并接着每隔一天 (q2d) 用盐水治疗(图 26,三角形)、或用抗 Cad-11 抗体 H1M1(图 26,正方形)或 H14(图 26,圆形)之一以 0.3mg/ 剂量 q2d 治疗。对照组由 5 只小鼠组成,并且治疗组由 7 只小鼠组成。与关节炎相关联的关节肿胀是通过每隔一天采取的卡尺测量来确定的。

[0197] 结果

[0198] 研究 1- 相对于对照小鼠, H1M1 抗 -Cad-11 抗体抑制了关节肿胀。与关节炎相关

联的关节肿胀的最大抑制是通过每隔一天用 0.3mg 的 H1M1 抗体对经 KBN 处理的小鼠进行给药来进行观察的（图 25，圆形）。

[0199] 研究 2- 相对于对照，这两种抗 -Cad-11 抗体均抑制了关节肿胀。在这项研究中，与这些对照动物相比，这种 H14 抗体显著地延迟了关节炎的发作（图 27）。在对照组中所有小鼠都在第 3 天发展成了关节炎，而在所有这些动物发展成关节炎之前 H14 治疗的小鼠要求 6 天。

[0200] 这些研究表明对抗人类 Cad-11 的 EC1 结构域的抗体可以在体内抑制关节炎的发展和严重程度。

[0201] 实例 9：对抗人类钙黏着蛋白 -11 的另一种 EC1 结构域肽的抗体的产生。

[0202] 材料和方法

[0203] 用 0.01mg 的肽 V19-Y37 (VL VGR LH SDIDS GDGNI KY (SEQ IDNO:12)) 在足垫处对 Balb/c 小鼠进行免疫，一周两次，一个月 9 次，这种肽与人类 Cad-11EC1 结构域的 19 个氨基酸相对应、以共价键与 BSA 相连接。这种肽在此被称作肽 3。从经免疫的小鼠中得到脾，并且将其与一种鼠融合伴侣 P3X63-Ag8.653 融合，从而生成产生抗体的杂交瘤。将这些杂交瘤扩展，并且对来自这些杂交瘤的、包含抗 Cad-11 抗体的培养基筛选与一种蛋白相结合的能力，该蛋白对应于在细菌中产生的 Cad-11 的 EC1-2 结构域。同时，对来自这些肽 3 杂交瘤的、包含抗 -Cad-11 抗体的培养基筛选与涵盖 Cad-8 和 MN-- 钙黏着蛋白的 EC1-2 结构域的蛋白相结合的缺失。在 4℃ 下用 0.05ml 的 0 至 300mg/ml 的 EC1-2Cad 蛋白中每一种蛋白、或 CHO 细胞产生的 EC1-Fc 融合蛋白将 96- 孔 EIA 板包被过夜，并接着用盐水缓冲液洗涤若干次。然后，用 0.25ml 的酪蛋白-PBS 缓冲液封闭这些板，并且随后用盐水缓冲液洗涤若干次。在 22℃ 下将含有这些肽 3 抗 Cad-11 抗体的杂交瘤培养基在每个孔中未稀释地孵育 1 小时，并接着用 PBS-Tween (0.05%) 洗涤两次。将 100 μl 的一种羊抗小鼠 IgG 二抗的 1/1000 稀释液加入到每个孔中，在 22℃ 下孵育 30 分钟，并接着用 PBS-Tween (0.05%) 洗涤两次。将 100 μl/ 孔的室温 TMB (3,3',5,5'- 四甲基联苯胺) 试剂加入到每个孔，并且允许在 22℃ 下显色 5 分钟。用 100 μl 的室温的 2N 硫酸将该反应终止，并且在 Wallac 1420 酶标仪上在 450nm 下读取该板。

[0204] 还对来自这些肽 3 杂交瘤的培养基测试了与在细胞上表达的人类 Cad-11 蛋白相结合的能力。冰冻的表达 Cad-11 的 431D 细胞被解冻，并且在含有 Ca^{2+} 的 HBSS 中洗涤两次，并接着以 10^6 个细胞 /ml 在含有 Ca^{2+} 的 HBSS 中重悬。用 50% 或 16% 抗 Cad-11 抗体培养基在冰上将 10^5 个细胞 / 孔染色 45 分钟，在含有 Ca^{2+} 的 HBSS 中洗涤两次，并接着用一种与藻红蛋白相偶联的羊抗小鼠 IgG 二抗以 1% 的浓度在冰上染色 45 分钟，并接着在含有 Ca^{2+} 的 HBSS 中再次洗涤两次。然后，在含有 Ca^{2+} 和 1% 甲醛的 400 μl HBSS 中将这些细胞重悬，并且随后在 FACScalibur 上对 PE 阳性细胞进行分析。

[0205] 结果

[0206] 来自来自这些肽 3 杂交瘤的、包含抗 -Cad-11 抗体的培养基与 Cad-11EC1-2 蛋白以及 EC1-Fc 融合蛋白相结合（图 28，对应地是 HL 对比 Cad11 以及 HL 对比 Cad11-EC1），但不结合包含 Cad-8 和 MN-Cad 的 EC1-2 结构域的蛋白（图 28，对应地是 HL 对比 Cad8、以及 HL 对比 MNCAD）。对照杂交瘤培养基不结合任何钙黏着蛋白蛋白（图 28，Media 对比 CAD11、Media 对比 CAD8、并且 Media 对比 MNCAD）。

[0207] 来自这些肽 3 杂交瘤的抗 -Cad-11 抗体还与表达人类 Cad-11 蛋白的细胞相结合 (图 29, 见箭头), 但未与不表达 Cad-11 的对照细胞 (表达 Neos) 相结合。这种结果证实: 在这些杂交瘤中存在体外识别肽 3 和表达 Cad-11- 的细胞的抗 Cad-11 抗体。

[0208] 所有专利、公开的申请以及参考文献的有关传授内容都通过引用将其全文进行结合。

[0209] 尽管本发明已经通过参考本发明的示例性实施方案进行了具体地显示和说明, 本领域中的普通技术人员应当理解在其中可以在形式和细节方面做出不同的改变, 而没有偏离由所附的权利要求所涵盖的本发明的范围。

[0210] WO 2009/089062 PCT/US2009/000162

[0211]

申请人或代理人的档案号 :4164. 1000001	国际申请号 :未收到
----------------------------	------------

[0212] 微生物及其他生物材料保藏的有关说明

[0213] (PCT/ 细则 13 之二)

[0214]

A. 以下做出的说明涉及在本说明书第15页第17行和第21行; 第41页第9行和第11行; 第54页第12行、第14行、第16行和第19行中所提及的保藏的微生物及其他生物材料。	
B. 保藏的识别 另外的保藏在附加页上指明。	
保藏机构名称: 美国种质保存中心 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION)	
保藏机构地址 (包括国家及邮政编码): American Type Culture Collection 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America	
保藏日: 2009 年 1 月 8 日	登录号: 未收到
C. 附加说明 (若不适用则留下空格) 此项信息在附加页上继续 ☒	
关于欧洲专利的指定国, 本申请人特此通知国际局如下: 本申请人希望直至欧洲专利授权公布之时或如果本申请被驳回或撤回或视为撤回是自申请日起 20 年之内, 由美国种质保存中心 (American Type Culture Collection) 保藏的登录号为 _____ 的生物材料只能按照《欧洲专利公约实施细则 28(3)》之规定向请求人指定的专家提供 (《欧洲专利公约实施细则 28(4)》)。	
D. 所述说明适用的指定国家 (若本说明不适用于所有指定国家)	
E 分别提供说明 (若不适用则保持空白)	
以下所列说明将随后将提交国际局 (请注明说明的一般性质, 例如: 保藏的登录号)	

[0215]

受理局专用	国际局专用
☐ 本页与国际申请同时收到	☐ 国际局于 _____ (日期) 收到本页
授权官员:	授权官员:

[0216] 基于 PCT/RO/134 (1998 年 7 月; 2004 年 1 月重印)

[0217] 关于保藏的微生物以及其他生物材料的说明

[0218] (附加页)

[0219] C. 附加说明(续前页)

[0220] 关于本主题 PCT 申请在澳大利亚的指定,按照《澳大利亚专利实施细则 3.25(3)》,本申请人特此通知由美国种质保存中心(American Type CultureCollection)保藏的登录号为(未收到)的生物材料样本只能在专利授权之前,或者在该申请失效、驳回或撤回之前提供给专业的受送达人,该受送达人与该发明无利益关系且应在提供样本请求书中提名。

[0221] 关于本主题 PCT 申请在加拿大的指定,本申请人在此通知国际局如下:本申请人希望,直至在本申请的基础上已经授予一份加拿大专利或者本申请已经被驳回、或被放弃且不再能恢复、或被撤回,专利局长仅可授权将美国种质保存中心(American Type Culture Collection)保藏的登录号为(未收到)且在本申请中提及的生物材料样本提供给由局长提名的一位独立专家。

[0001]

序列表

<110> Synovex Corporation
McArthur, James G.

<120> 用于治疗炎性关节障碍的钙黏着蛋白-11 EC1结构域拮抗剂

<130> 4164.1000001

<140> PCT/US2009/000162

<141> 2009-01-09

<150> 61/010,734

<151> 2008-01-11

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3654

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```
agatgccgcg ggggccgctc gcagccgccc ctgacttgtg aatgggaccg ggactggggc 60
gggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggactg gggctcggga ggttgcgctc 120
accctcaagg gccccagaaa tcacttgttt ttcagctcag cggccctgtg acattccctc 180
gtgttgtcat ttgttgatg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc 240
aagtatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag 300
ctcaaccagc agagacattc catcccaaga gaggctcgtg tgacgcgtcc gggaggccac 360
cctcagcaag accaccgtac agttgggtga aggggtgaca gctgcattct cctgtgccta 420
ccacgttaacc aaaaatgaag gagaactact gtttacaagc cggccctggg tgccctggga 480
tgctgtgcca cagccatgcc ttgcccccag agcggcgggg gcacctgcgg cctcctctcc 540
atggggacca tgagaagggc aaggaggggc aggtgtctaca ggcctccaag cgtggctggg 600
tctggacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggccc tgaccccggt cttgtgggca 660
ggccttcattc agatattgac tctgtgatg ggaacattaa atacattctc tcagggggag 720
gagctggaac catttttgtg attgatgaca aatcagggaa cattcatgcc accaagacgt 780
tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcggtggac agggacacca 840
atcgccaccat ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggt ccaggacatt aatgacaacc 900
ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagaggtcc aatgtgggaa 960
cgtcagtaat ccaggtgaca gcttcagatg cagatgaccc cacttatgga aatagcgcca 1020
agttagtgt cagtatcctc gaaggacaac cctatttttc ggtgggaagc cagacaggta 1080
tcacagaaac agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaaggatgc cactgtgtga 1140
tccagcccaa ggacatgggt ggacatatgg ggcgactctc agggacaacc aaagtacga 1200
tcacactgac cgtatgcaat gacaaccacc caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt 1260
ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaaagct aaagatccag 1320
acattggaga aaatggccta gtacataaca atattgttga tggagatggt atggaatcgt 1380
ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg agggggtgat aaagctgaaa aagcctgtag 1440
atttgaac caaaaagacc tatagcttga aggtagaggc agccaacgtg cacatcgacc 1500
cgaagtttat cagcaatggc cctttcaagg acactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag 1560
atgctgatga gcccccctatg ttcttggccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg 1620
cagctgtctgg caccgtggtt gggagagttgc atgccaaaaga ccctgatgct gccaacagcc 1680
cgataaggtta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag atttttact attaatccag 1740
aggatgggtt tattaaaact acaaaaccctc tggatagaga ggaacagacc tggtcaaca 1800
tcactgtctt tgcagcagaa atccacaate ggcacagga agccaaagtc ccagtggcca 1860
ttagggtcct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgccccttat gaaggtttca 1920
tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag 1980
atgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatattatct cagcctaccc cctgaatca 2040
ttcacaatcc aaatttcaca gtacagagaca accgagataa cacagcagge gtgtacgccc 2100
ggcgtggagg gttcagtcgg cagaagcagg acttgtacct tctgcccata gtatcagcg 2160
atggcggcat cccgcccctg agtagcaca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg 2220
acgtgaacgg ggcactgctc tcctgcaacg cagaggcccta cattctgaac gccggcctga 2280
gcacaggcgc cctgatcgcc atcctcgect gcacgtgcat tctcctggtc attgtagtat 2340
tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg 2400
tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aagggggtgg ggaagaagac acagaagcct 2460
ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca 2520
tcaaacctga gtatcagtac atgectagac ctgggctccg gccagcgccc aacagcgtgg 2580
atgtcgatga cttcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc accgctctc 2640
cttatgactc cattcaaatc tacggttatg aaggcagggg ctcagtggcc gggctccctga 2700
gtcctcctaga gtggccacc acagattcag acttggacta tgattatcta cagaactggg 2760
gacctgttt taagaaacta gcagatttgt atggttccaa agacactttt gatgacgatt 2820
cttaacaata acgatacaaa ttggccctta agaactgtgt ctggcgttct caagaatcta 2880
gaagatgtgt aaacaggtat ttttttaaat caaggaaagg ctcattttaa acaggcaag 2940
```

[0002]


```

ttttacagag aggatacatt taataaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga 3000
aatacctttt ctacacaaaa ggcaaatatt gaagtgttt atcaacttcg ctagaaaaaa 3060
aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgtga actgacaatg 3120
aagggaattt gtttatgtgt tatgaacatc caagtctttc ttcttttta agttgtcaaa 3180
gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gtctgagct gtaatttcgc cttaaactct 3240
ggacactcta tatgtagtgc atttttaaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa 3300
cccatacaat giatgiacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcatc aatcttgta 3360
ctgctgattc ttgtaaatct ttttgcttct acittcatct taaactaata cgtgccagat 3420
ataactgtct tgtttcagtg agagacgccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt 3480
tgtacaattt taaagtctct attttagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa 3540
gaaaatgtta cggcatacaca cttatatatt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag 3600
cttcaatata agaagcaatc tttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa 3654

```

<210> 2

<211> 796

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```

Met Lys Glu Asn Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met
1 5 10 15
Leu Cys His Ser His Ala Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg
20 25 30
Pro Ser Phe His Gly His His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu
35 40 45
Gln Arg Ser Lys Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu
50 55 60
Glu Tyr Thr Gly Pro Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp
65 70 75 80
Ile Asp Ser Gly Asp Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly
85 90 95
Ala Gly Thr Ile Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala
100 105 110
Thr Lys Thr Leu Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala
115 120 125
Gln Ala Val Asp Arg Asp Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro Pro Ser Glu
130 135 140
Phe Ile Val Lys Val Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe Leu
145 150 155 160
His Glu Thr Tyr His Ala Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn Val Gly Thr
165 170 175
Ser Val Ile Gln Val Thr Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly
180 185 190
Asn Ser Ala Lys Leu Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr Phe
195 200 205
Ser Val Glu Ala Gln Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn Met
210 215 220
Asp Arg Glu Ala Lys Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys Asp
225 230 235 240
Met Gly Gly His Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr Ile
245 250 255
Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro Gln Ser Val
260 265 270
Tyr Gln Met Ser Val Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu Glu Val Gly
275 280 285
Arg Val Lys Ala Lys Asp Pro Asp Ile Gly Glu Asn Gly Leu Val Thr
290 295 300
Tyr Asn Ile Val Asp Gly Asp Gly Met Glu Ser Phe Glu Ile Thr Thr
305 310 315 320
Asp Tyr Glu Thr Gln Glu Gly Val Ile Lys Leu Lys Lys Pro Val Asp
325 330 335
Phe Glu Thr Lys Arg Ala Tyr Ser Leu Lys Val Glu Ala Ala Asn Val
340 345 350
His Ile Asp Pro Lys Phe Ile Ser Asn Gly Pro Phe Lys Asp Thr Val
355 360 365
Thr Val Lys Ile Ser Val Glu Asp Ala Asp Glu Pro Pro Met Phe Leu
370 375 380
Ala Pro Ser Tyr Ile His Glu Val Gln Glu Asn Ala Ala Ala Gly Thr
385 390 395 400
Val Val Gly Arg Val His Ala Lys Asp Pro Asp Ala Ala Asn Ser Pro
405 410 415
Ile Arg Tyr Ser Ile Asp Arg His Thr Asp Leu Asp Arg Phe Phe Thr
420 425 430
Ile Asn Pro Glu Asp Gly Phe Ile Lys Thr Thr Lys Pro Leu Asp Arg
435 440 445
Glu Glu Thr Ala Trp Leu Asn Ile Thr Val Phe Ala Ala Glu Ile His

```

[0003]

```

450      455      460
Asn Arg His Gln Glu Ala Lys Val Pro Val Ala Ile Arg Val Leu Asp
465      470      475
Val Asn Asp Asn Ala Pro Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu Gly Phe Ile
      485      490      495
Cys Glu Ser Asp Gln Thr Lys Pro Leu Ser Asn Gln Pro Ile Val Thr
      500      505      510
Ile Ser Ala Asp Asp Lys Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ile
      515      520      525
Phe Ser Leu Pro Pro Glu Ile Ile His Asn Pro Asn Phe Thr Val Arg
      530      535      540
Asp Asn Arg Asp Asn Thr Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg Gly Gly Phe
545      550      555
Ser Arg Gln Lys Gln Asp Leu Tyr Leu Leu Pro Ile Val Ile Ser Asp
      565      570      575
Gly Gly Ile Pro Pro Met Ser Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Lys Val
      580      585      590
Cys Gly Cys Asp Val Asn Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn Ala Glu Ala
      595      600      605
Tyr Ile Leu Asn Ala Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Ile Ala Ile Leu
      610      615      620
Ala Cys Ile Val Ile Leu Leu Val Ile Val Val Leu Phe Val Thr Leu
625      630      635
Arg Arg Gln Lys Lys Glu Pro Leu Ile Val Phe Glu Glu Glu Asp Val
      645      650      655
Arg Glu Asn Ile Ile Thr Tyr Asp Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp
      660      665      670
Thr Glu Ala Phe Asp Ile Ala Thr Leu Gln Asn Pro Asp Gly Ile Asn
      675      680      685
Gly Phe Ile Pro Arg Lys Asp Ile Lys Pro Glu Tyr Gln Tyr Met Pro
      690      695      700
Arg Pro Gly Leu Arg Pro Ala Pro Asn Ser Val Asp Val Asp Asp Phe
705      710      715
Ile Asn Thr Arg Ile Gln Glu Ala Asp Asn Asp Pro Thr Ala Pro Pro
      725      730      735
Tyr Asp Ser Ile Gln Ile Tyr Gly Tyr Glu Gly Arg Gly Ser Val Ala
      740      745      750
Gly Ser Leu Ser Ser Leu Glu Ser Ala Thr Thr Asp Ser Asp Leu Asp
      755      760      765
Tyr Asp Tyr Leu Gln Asn Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp
      770      775      780
Leu Tyr Gly Ser Lys Asp Thr Phe Asp Asp Asp Ser
785      790      795

```

<210> 3
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 3
 Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro
 1 5 10 15
 Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp
 20 25 30
 Gly Asn

<210> 4
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4
 Gly Trp Val Trp Asn Gln Met Phe Val Leu Glu Glu Phe Ser Gly Pro
 1 5 10 15
 Glu Pro Ile Leu Val Gly Arg Leu His Thr Asp Leu Asp Pro Gly Ser
 20 25 30
 Lys Lys

<210> 5
 <211> 34
 <212> PRT

[0004]

<213> 人

<400> 5

Ser Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Leu Glu Glu Tyr Thr Gly Thr
 1 5 10 15
 Asp Pro Leu Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp Met Asp Arg Gly Asp
 20 25 30
 Gly Ser

<210> 6

<211> 1145

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Cad-11-EC1-FC融合编码序列

<400> 6

atgaaggaga actactgttt acaagccgcc ctggtgtgcc tgggcatgct gtgccacagc 60
 catgcctttg cccagagcgg gcgggggcac ctgcggccct ccttccatgg gcacccatgag 120
 aaggccaagg aggggcaggt gctacagcgc tccaagcgtg gctgggtctg gaaccagtgc 180
 ttcgtgatag aggagtacac cgggcctgac cccgtgcttg tgggcaggct tcattcagat 240
 attgactctg gtgatgggaa cattaaatac attctctcag gggaaggagc tgggaaccatt 300
 tttgtgattg atgacaaatc agggaaacatt catgccacca agacgttgga tcgagaagag 360
 agagcccgat acacgttgat ggctcaggcg gtggacaggg acaccaatcg gccactggag 420
 ccaccgtcgg aattcattgt caaggtccag agatctgttg agtgcccacc ttgcccgaca 480
 ccactgttgg caggaccttc agtcttcctc ttcccccaa aaccaagga caccctgatg 540
 atctccagaa cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctcag 600
 gtccagttca actggtacgt ggacggcatg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg 660
 gaggagcagt tcaacagcac gtcccgctgt gtcagcgtcc tcaccgtcgt gcaccaggac 720
 tggtgaacg gcaaggagta caagtgcagg gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc 780
 gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 840
 ccattccggg agggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 900
 taccccagcg acatgccctg ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 960
 accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1020
 gacaagagca ggtggcagca gggaacgtc ttctcatgct cctgatgca tgaggctctg 1080
 cacaaccact acacacagaa gaggctctcc ctgtctccgg gtaaatgagt gccacggcta 1140
 gctgg 1145

<210> 7

<211> 380

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Cad-11-EC1-Fc融合蛋白

<400> 7

Met Lys Glu Asn Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met
 1 5 10 15
 Leu Cys His Ser His Ala Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg
 20 25 30
 Pro Ser Phe His Gly His His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu
 35 40 45
 Gln Arg Ser Lys Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu
 50 55 60
 Glu Tyr Thr Gly Pro Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp
 65 70 75 80
 Ile Asp Ser Gly Asp Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly
 85 90 95
 Ala Gly Thr Ile Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala
 100 105 110
 Thr Lys Thr Leu Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala
 115 120 125
 Gln Ala Val Asp Arg Asp Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro Pro Ser Glu
 130 135 140
 Phe Ile Val Lys Val Gln Arg Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 145 150 155 160
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 165 170 175
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 180 185 190
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 195 200 205

[0005]

Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 210 215 220
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 225 230 235 240
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 245 250 255
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 260 265 270
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 275 280 285
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Ala
 370 375 380

<210> 8
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物序列

<400> 8
 ttttttttg aattcatgaa ggagaactac tgtttacaag c 41

<210> 9
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物序列

<400> 9
 ttttttttta gatctctgga ccttgacaat gaattccgac gg 42

<210> 10
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10
 Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro
 1 5 10 15
 Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp
 20 25 30
 Gly

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 11
 Gly Pro Asp Pro
 1

<210> 12
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12

[0006]

Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp Gly Asn
 1 5 10 15
 Ile Lys Tyr

<210> 13
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 13
 Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro
 1 5 10 15
 Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp
 20 25 30
 Gly Asn Ile Lys Tyr
 35

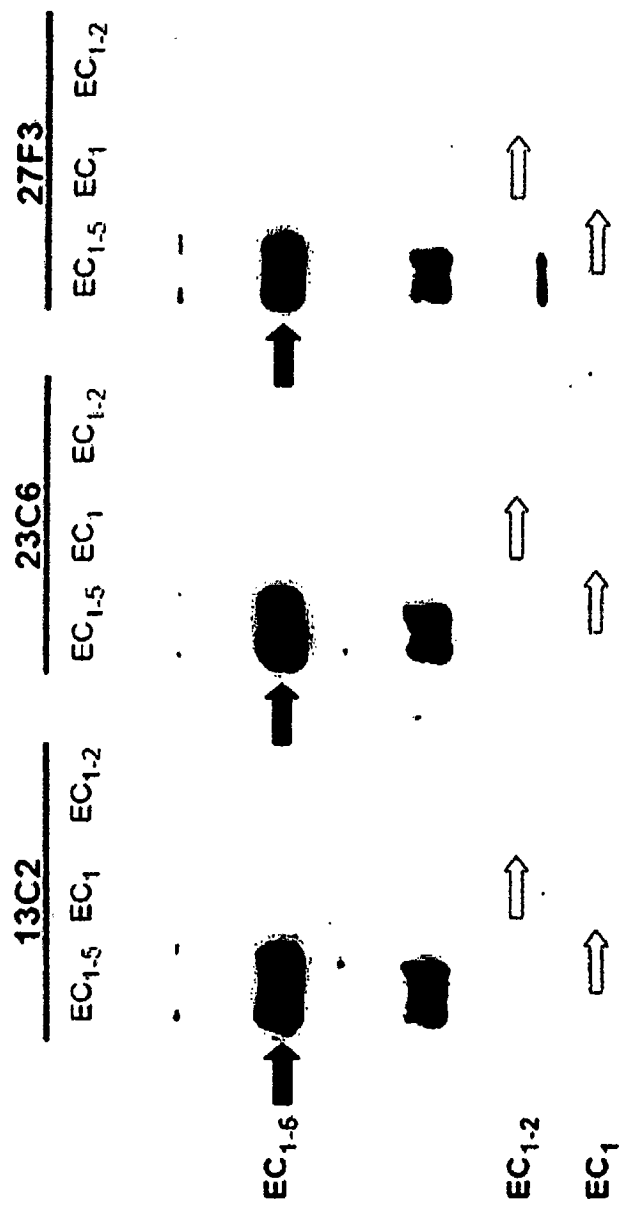


图 1A

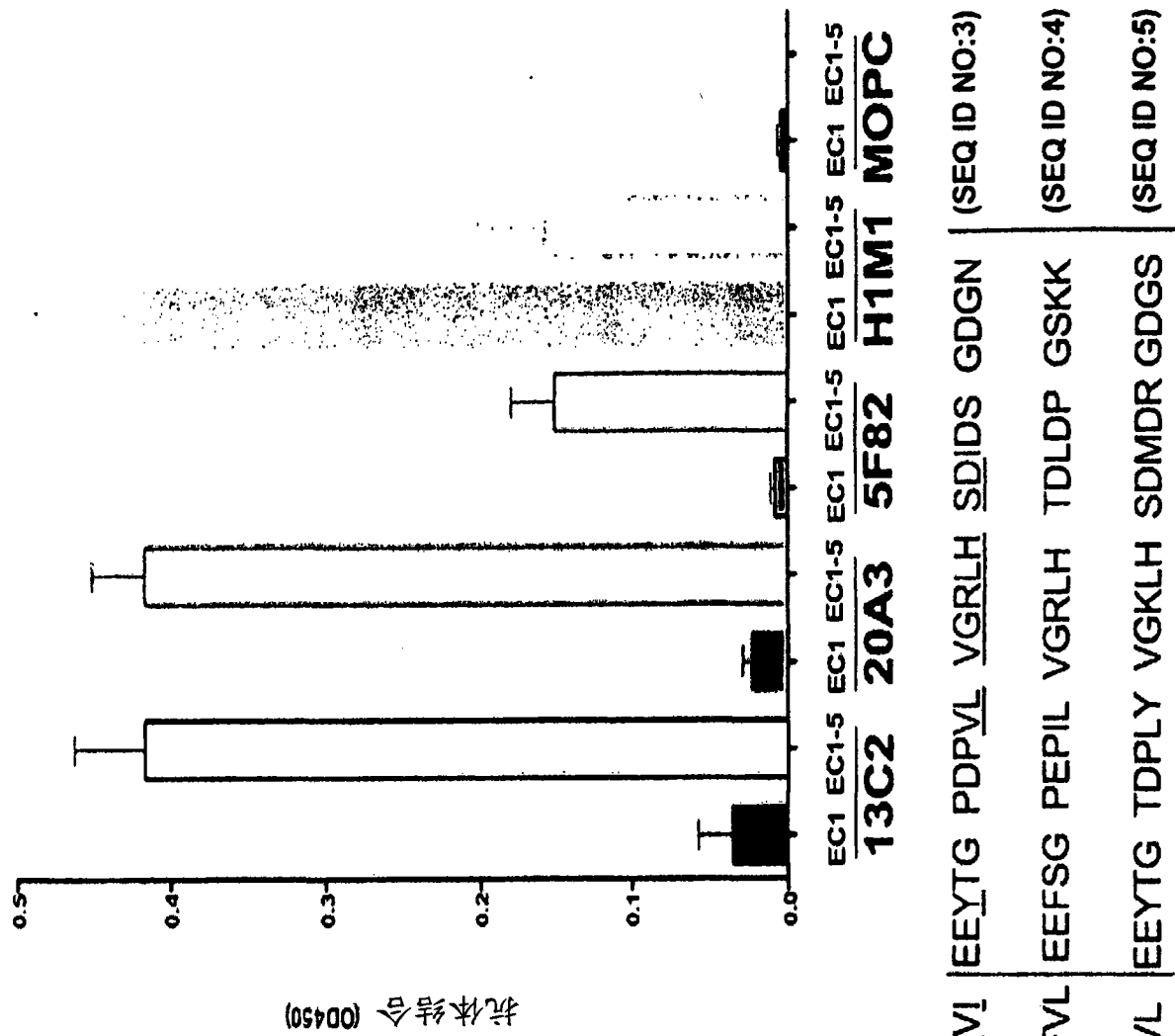


图 1B

人类	Cad-11	<u>GWVWN</u>	<u>QFFVI</u>	<u>EEYT</u> G	<u>PDPVL</u>	<u>VGR</u> LH	<u>SD</u> IDS	GDGN	(SEQ ID NO:3)
人类	Cad-8	GWVWN	QMFVL	EEFSG	PEPIL	VGRLH	TDLP	GSKK	(SEQ ID NO:4)
人类	MN-Cad	SWVWN	QFFVL	EEYTG	TDPLY	VGKLH	SDMDR	GDGS	(SEQ ID NO:5)

图 2

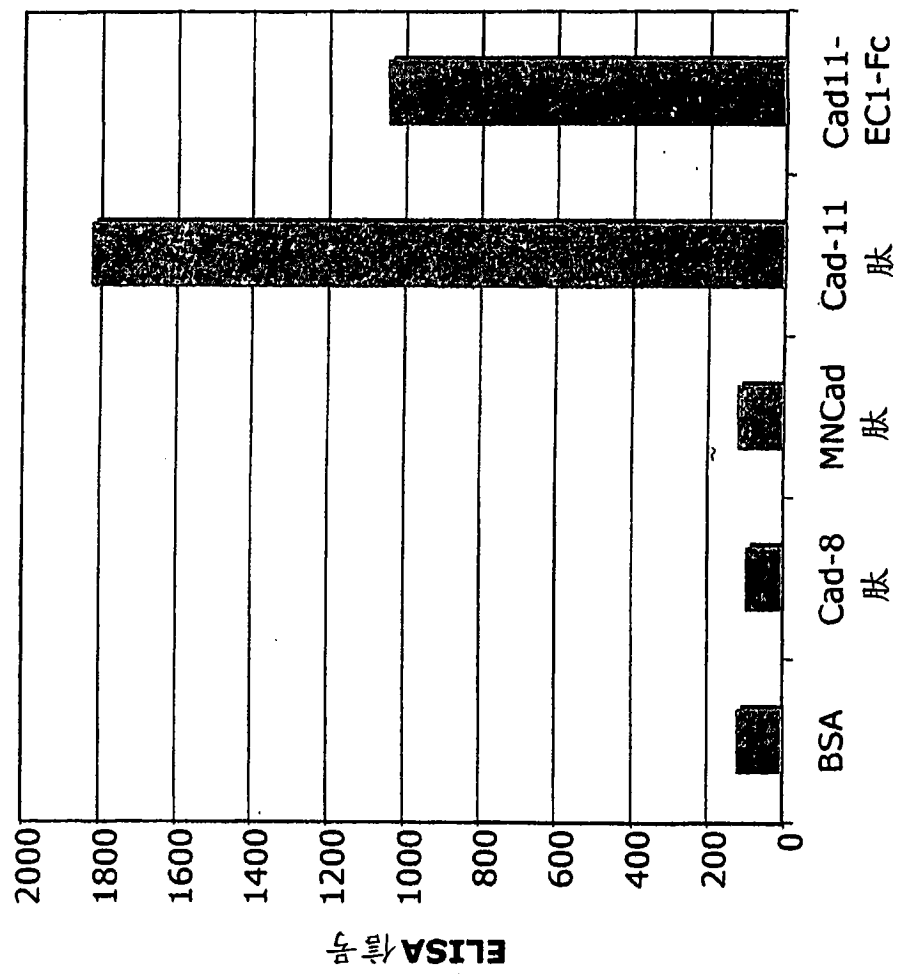


图 3

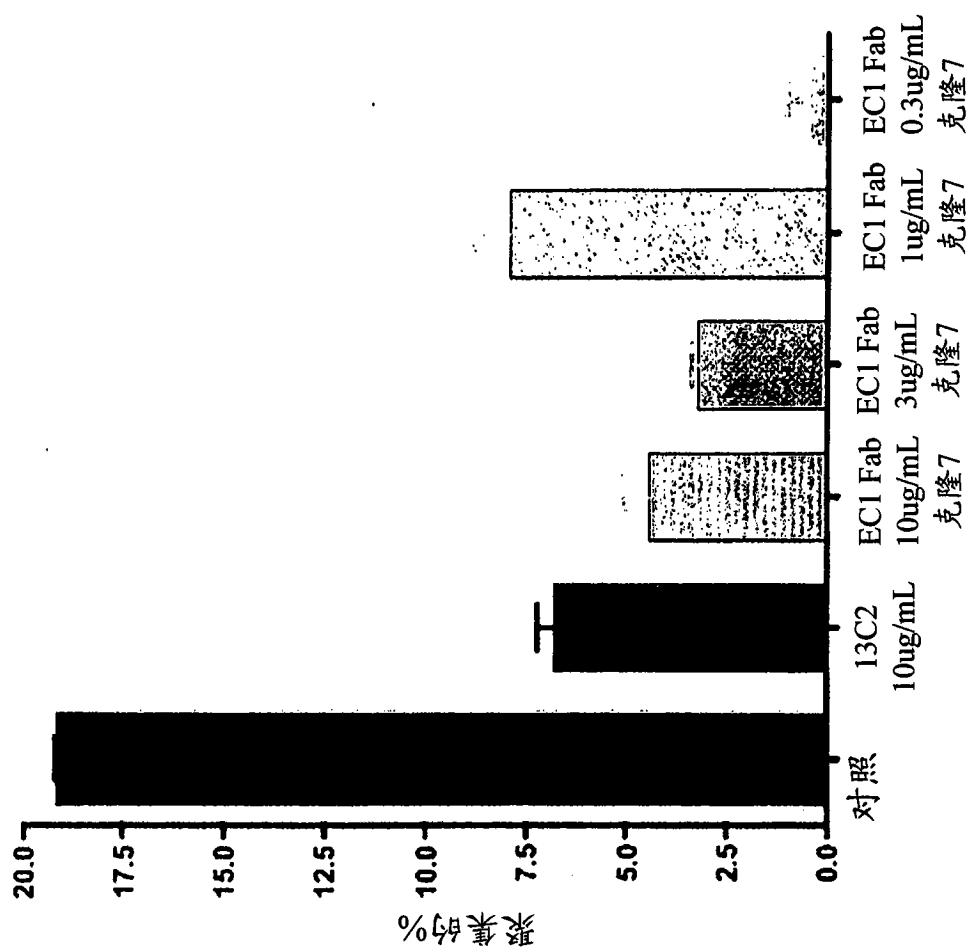


图 4

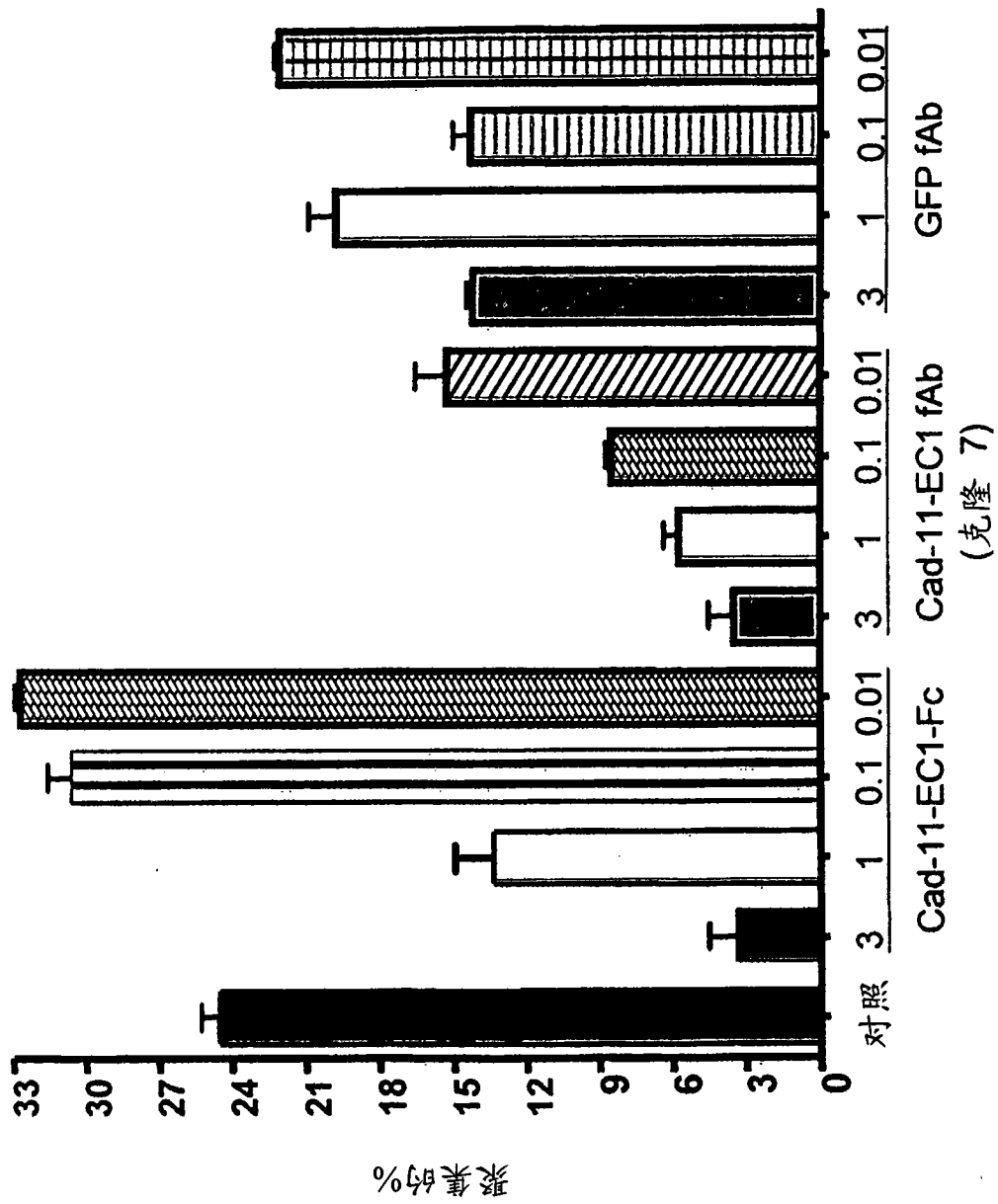


图 5

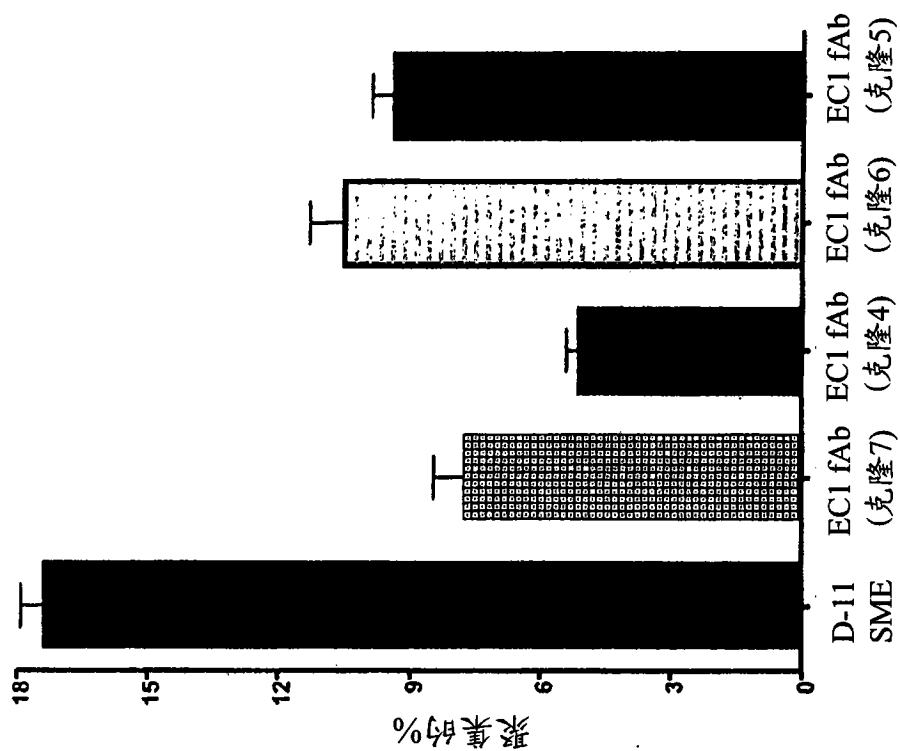


图 6

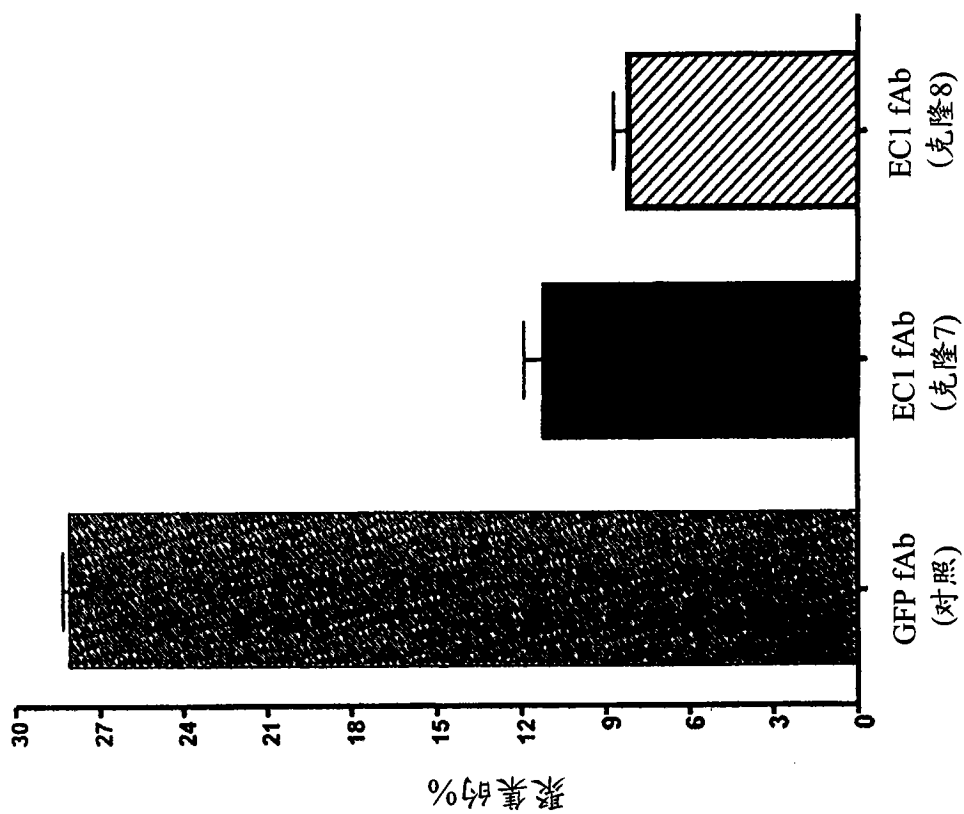


图 7

ATGAGGAGAACTACTGTTTACAAGCCGCCCTGGTGTGCTGGGCATGCTGTGCCACAGCCATGCCCTTTGC
CCCAGAGCGGGGCACCTGCGGCCCTCCTTCCATGGGCACCATGAGAAGGGCAAGGAGGGCAGG
TGCTACAGCGCTCCAAGCGTGGCTGGTCTGGAACCAAGTTCTTCGTGATAGAGGAGTACACCGGGCCTGA
CCCCGTGCTTGTGGCAGGCTTCATTGAGATATTGACTCTGGTGATGGGAACAATTAAATACATTCTCTCAGG
GGAAGGAGCTGGAACCAATTTTGTGATTGATGACAAATCAGGGAACATTCATGCCACCAAGACGTTGGATC
GAGAAGAGAGAGCCAGTACACGTTGATGGCTCAGGCGTGGACAGGGACACCAATCGGCCACTGGAGC
CACCGTCGGAAATTCATTGTC AAGTCCAGAGATCTGTGGAGTGCCACCTTGCCAGCACCACTGTGGC
AGGACCTTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCC AAGGACACCCCTGATGATCTCCAGAACCCCTGAGGTC
ACGTGCGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCAGTTCAACTGGTACGTGACGGCAT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGTCAGCG
TCCTCACCGTCGTGCACGAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCA AACC AAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTACGCTGACCTGGTCA AAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACCTCC
CATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGACAAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAGAGCCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAATGAGTGCCACGGCTAGCTGG (SEQ ID NO:6)

图 8

MKENYCLQAALVCLGMLCHSHAFAPERRGHLRPSFHGHHEKGEQVLQRSKR
GWWNQFFVIEEYTGPDVLVGRLHSDIDSGDGNIKYILSGEGAGTIFVIDDKSGNI
HATKTLDREERAQYTLMAQAVDRDTNRPLEPPSEFIVKVQ
RSVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPMMLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKVPRLA (SEQ ID NO:7)

图 9

hCad11 EC1/2-hlgG2

hCad11 EC1-hlgG2

标志物 (kd)

250 130 95 72 55 36 28

图 10

hCad11 EC1/2-hlgG2

hCad11 EC1-hlgG2

标志物 (kd)

250 130 95 72 55 36 28 17

图 11

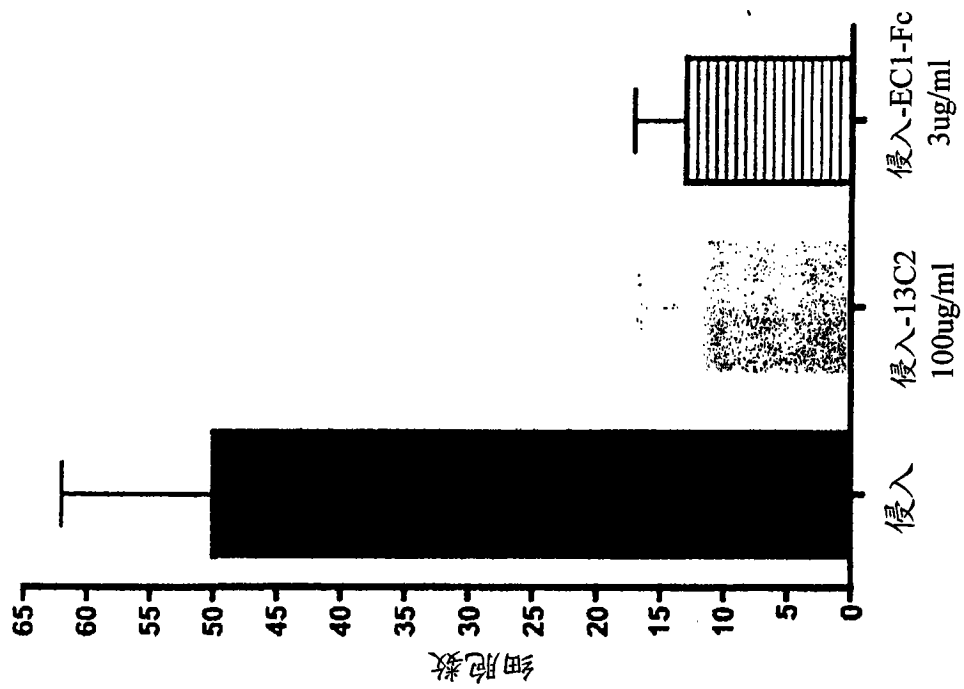


图 12

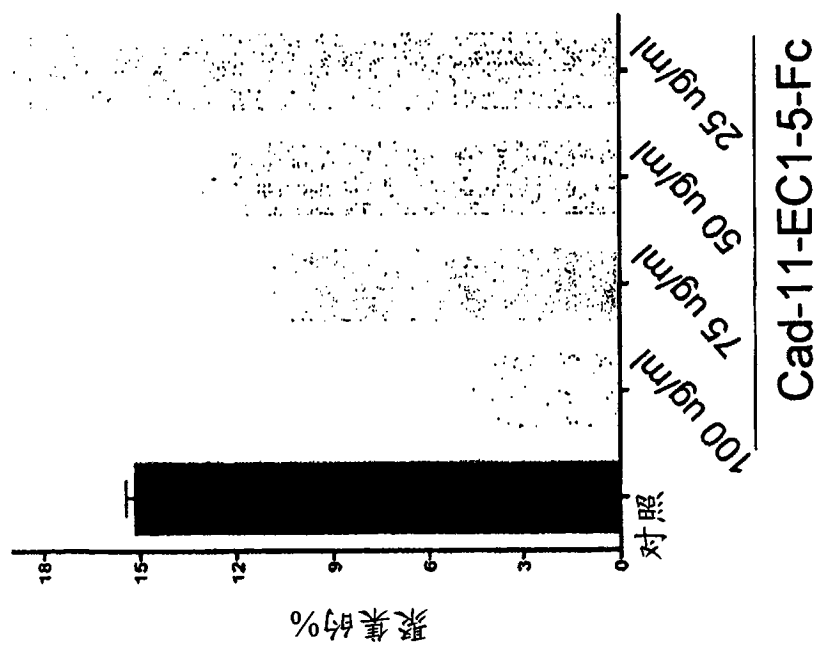


图 13A

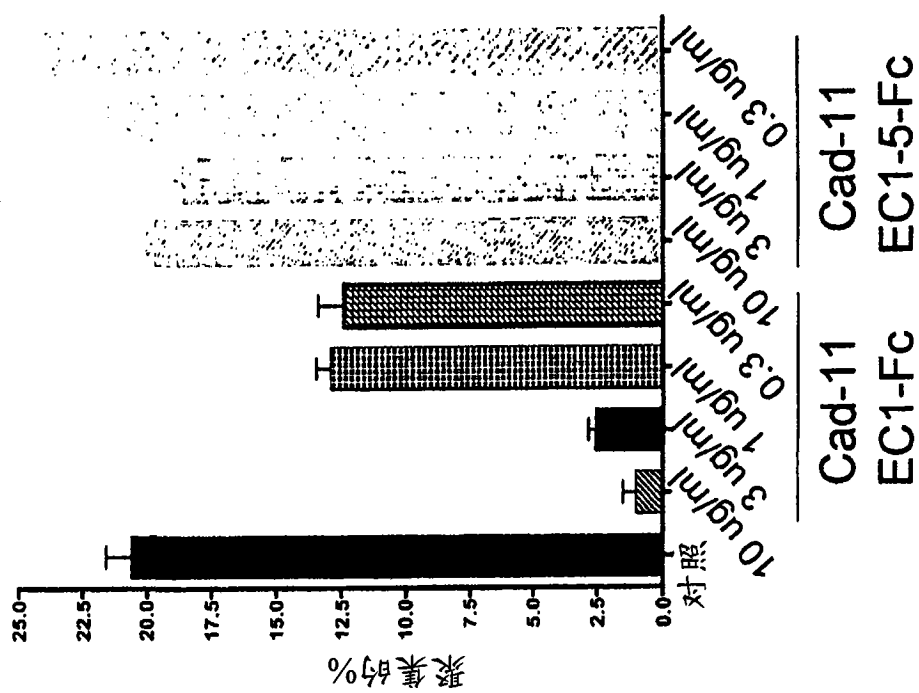


图 13B

1 agatgccgcg ggggccgctc gcagccgccg ctgacttgtg aatgggaccg ggactggggc
61 cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccaggggactg gcggctcggg ggttgcgctcc
121 accctcaagg gccccagaaa tcaactgtgtt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc
181 gtgttgtcat ttgttgagtg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc
241 aagtatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag
301 ctcaaccagc agagacattc catcccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac
361 cctcagcaag accaccgtac agttgggtga aggggtgaca gctgcattct cctgtgccta
421 ccacgtaacc aaaaatgaag gagaactact gtttacaagc cgccctgggtg tgcctgggca
481 tgctgtgcc aagccatgcc tttgccccag agcggcgggg gcacctgcgg ccctccttcc
541 atgggcacca tgagaagggc aaggaggggc aggtgctaca gcgctccaag cgtggctggg
601 tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggcc tgaccccggtg cttgtgggca
661 ggcttcattc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcaggggaag
721 gagctggaac catttttgtg attgatgaca aatcaggga cttcatgcc accaagacgt
781 tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcgggtggac agggacacca
841 atcgccact ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggc ccaggacatt aatgacaacc
901 ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagagggtcc aatgtgggaa
961 cgtcagtaat ccagggtgaca gcttcagatg cagatgaccc cacttatgga aatagcgcca
1021 agttagtgtg cagtatcctc gaaggacaac cctatttttc ggtggaagca cagacaggta
1081 tcatcagaac agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac cacgtggtga
1141 tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg gcggactctc agggacaacc aaagtgcga
1201 tcacactgac cgatgtcaat gacaaccac caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt
1261 ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaaagct aaagatccag
1321 acattggaga aaatggctta gtcacatata atattgttga tggagatggt atggaatcgt
1381 ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg agggggtgat aaagctgaaa aagcctgtag
1441 attttgaaac caaaagagcc tatagcttga aggtagaggc agccaacgtg cacatcgacc
1501 cgaagtttat cagcaatggc cctttcaagg aactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag
1561 atgctgatga gccccctatg ttcttgcccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg
1621 cagctgctgg caccgtggtt gggagagtgc atgccaaaga ccctgatgct gccaacagcc

图 14A

1681 cgataaggta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag attttttact attaatccag
1741 aggatgggtt tattaaaaact acaaaacctc tggatagaga ggaaacagcc tgggtcaaca
1801 tcaactgtctt tgcagcagaa atccacaatc ggcacagga agccaaagtc ccagtggcca
1861 ttagggctct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgccccttat gaaggtttca
1921 tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag
1981 atgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatttatctt cagcctaccc cctgaaatca
2041 ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcaggc gtgtacgccc
2101 ggcgtggagg gttcagtcg cagaagcagg acttgtacct tctgcccata gtgatcagcg
2161 atggcgggcat cccgcccctg agtagcacca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg
2221 acgtgaacgg ggcactgctc tcctgcaacg cagaggccta cattctgaac gccggcctga
2281 gcacaggcgc cctgatcgcc atcctcgctt gcacgtcat tctcctggtc attgtagtat
2341 tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg
2401 tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aagggggtgg ggaagaagac acagaagcct
2461 ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca
2521 tcaaacctga gtatcagtac atgcctagac ctgggctccg gccagcgccc aacagcgtgg
2581 atgtcgatga cttcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggctcctc
2641 cttatgactc cattcaaate tacggttatg aaggcagggg ctcatgggccc gggctccctga
2701 gctccctaga gtcggccacc acagattcag acttggaacta tgattatcta cagaactggg
2761 gacctcgttt taagaaacta gcagatttgt atgggtccaa agacactttt gatgacgatt
2821 cttaacaata acgatacaaa tttggcctta agaactgtgt ctggcgttct caagaatcta
2881 gaagatgtgt aaacaggtat ttttttaaat caaggaaagg ctcatttaaa acaggcaaaag
2941 ttttacagag aggatacatt taataaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga
3001 aatacctttt ctcaaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaacttcg ctagaaaaaa
3061 aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg
3121 aagggaaatt gtttatgtgt tatgaacatc caagtccttc ttctttttta agttgtcaaa
3181 gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttcgc cttaaactct
3241 ggacactcta tatgtagtgc attttttaaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa
3301 cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcatc aatcttgta
3361 ctgctgattc ttgtaaatct ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgccagat

图 14B

3421 ataactgtct tgtttcagtg agagacgcc tttttctatg tcatttttaa tgtatctatt
3481 tgtacaattt taaagttctt attttagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa
3541 gaaaatgtta cggcatcaca cttatatatt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag
3601 cttcaatata agaagcaatc tttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa (SEQ
ID NO:1)

图 14C

1 mkenyclqaa lvcigmlchs hafaperrgh lrpsfhghhe kgkegqvlqr skrgwvwnqf
61 fvieeytgp d pvlvgrlhsd idsgdgniky ilsgegagti fviddksgni hatktldree
121 raqytлмааа vdrdtnrple ppsefivkvq dindnppefl hetuhanvpe rsnvgtsvlg
181 vtsadaddpt ygnsaklvys ilegqpyfsv eaqtgiirta lpmndreake eyhvviqakd
241 mgghmgglsg ttkvtitltd vndnppkfpq svyqmsvsea avpgeevgrv kakdpdigen
301 glvtynivdg dgmesfeitt dyetqegvik lkkpvdftk rayslkveaa nvhidpkfis
361 ngpfkdtvtv kisvedadep pmflapsyih evqenaaagt vvgrvhakdp daanspirys
421 idrhtdlrfd ftinpedgfi ktkpldree tawlnitvfa aeihnrhgea kvpvairvld
481 vndnapkfaa pyegficesd qtkplsnqpi vtisaddkdd tangprfifs lppeiinhpn
541 ftvrdrndnt agvyarrggf srqkqdlyll pivisdggip pmsstntlti kvcgcdvnga
601 llscnaeayi lnaglstgal iailacivil lvivvlfvtl rrqkkepliv feedvreni
661 ityddegge edteafdiat lqnpdgingf iprkdikpey qymprpglrp apnsvdvddf
721 intriqeadn dptappydsi qiygyegrgs vagslssles attdsdldyd ylgwngprfk
781 kladlygskd tfddds (SEQ ID NO: 2)

图 15

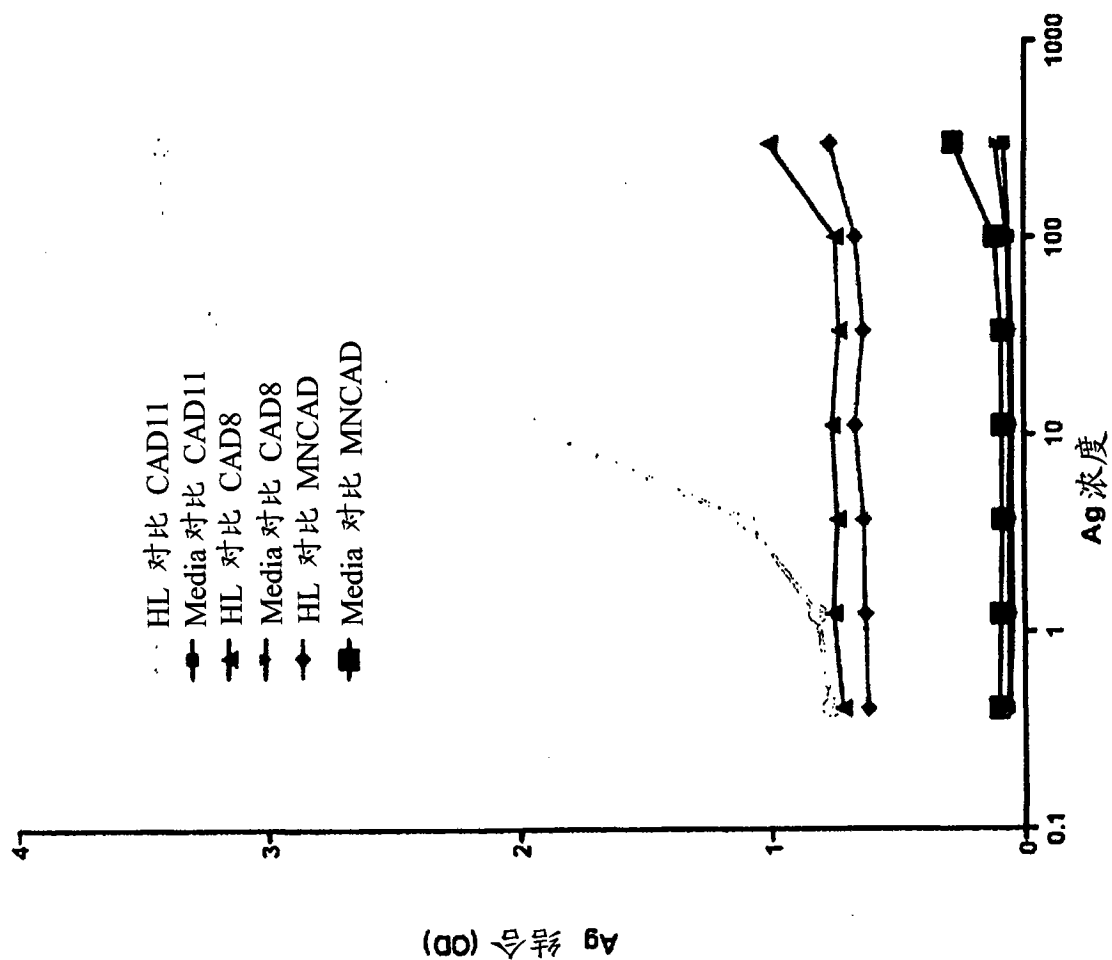


图 16

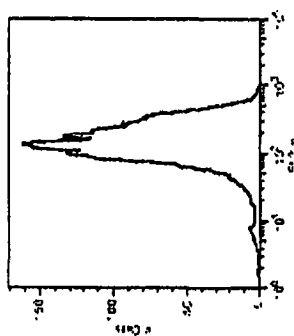


图 17A

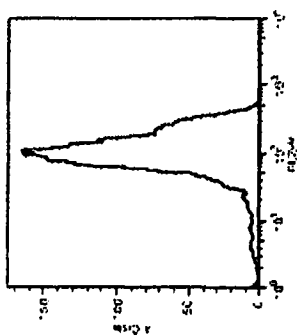


图 17B

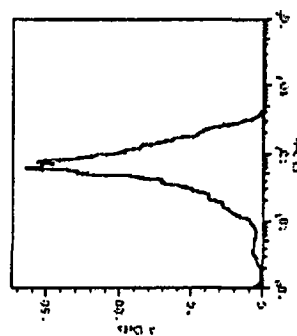
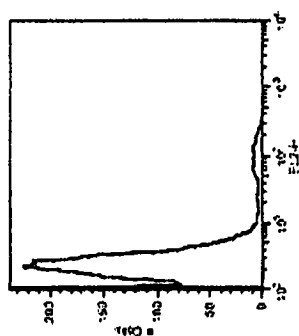


图 17C



H14
Cad11⁺ 细胞

图 17D

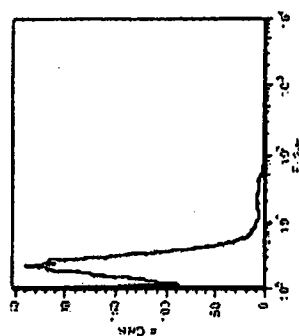
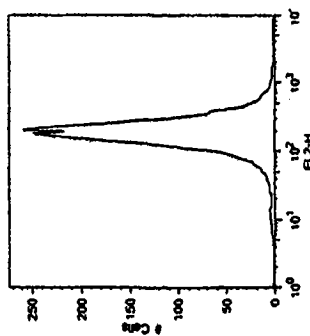


图 17E



图 17F



H1M1
Cad11⁺ 细胞

图 17G

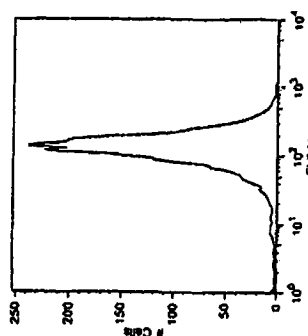


图 17H

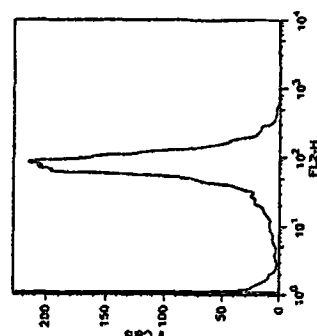


图 17I

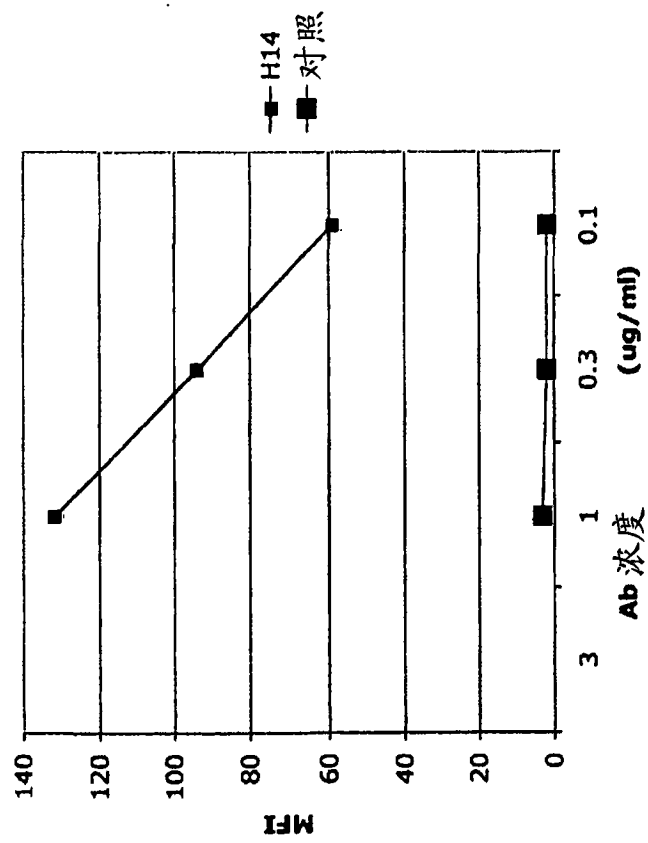


图 18A

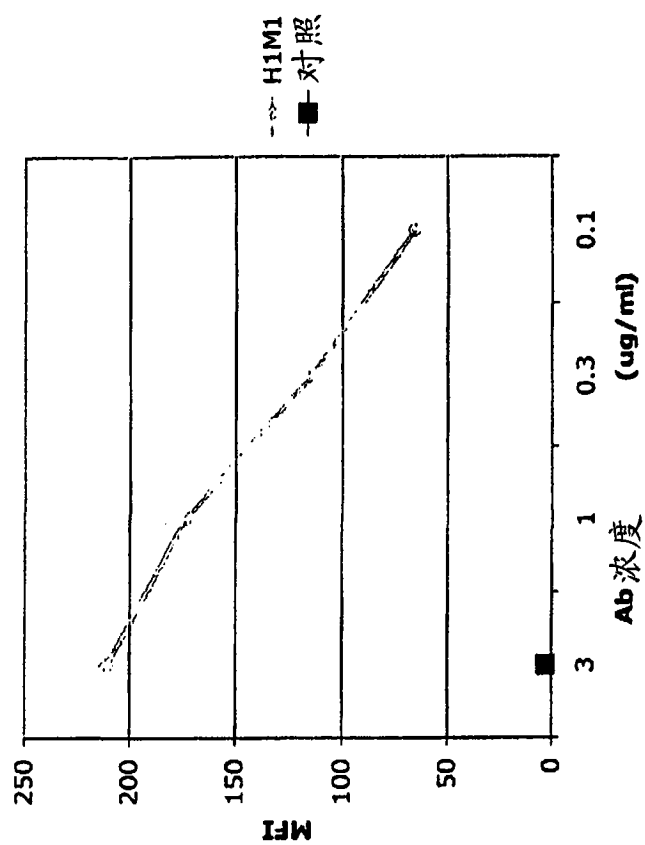


图 18B

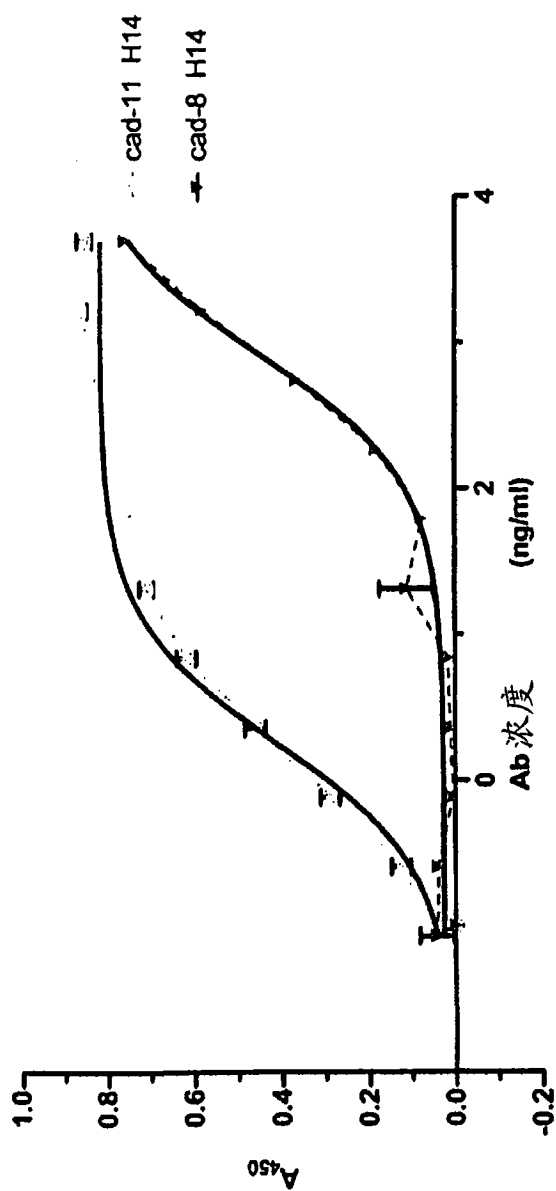


图 19A

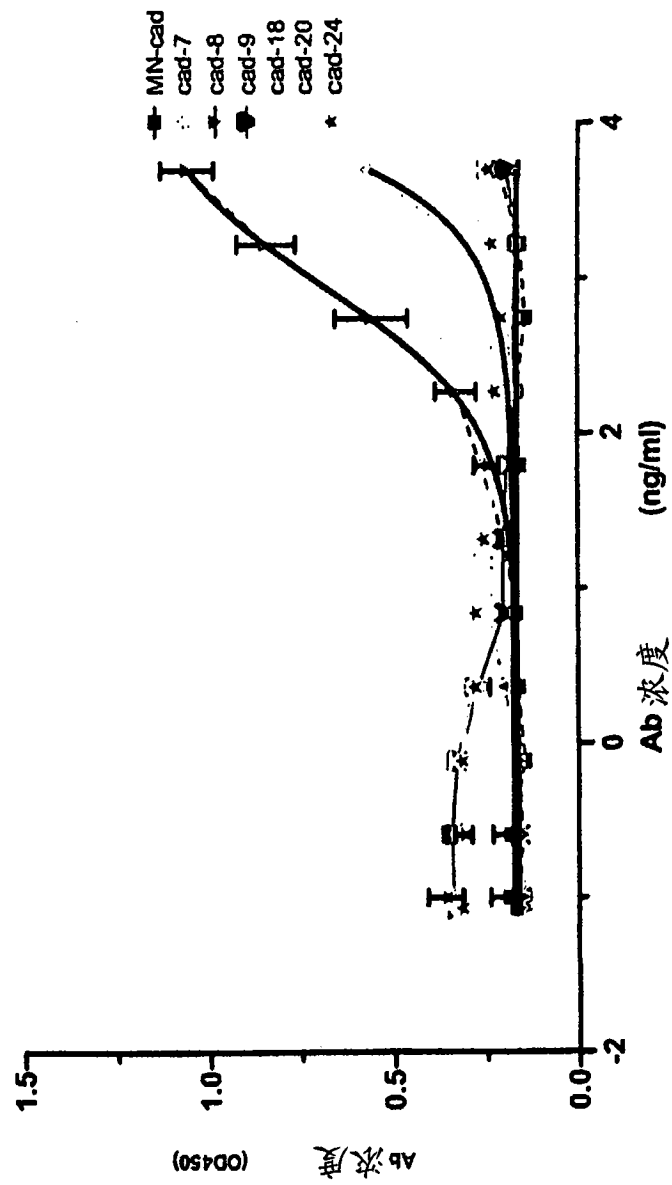


图 19B

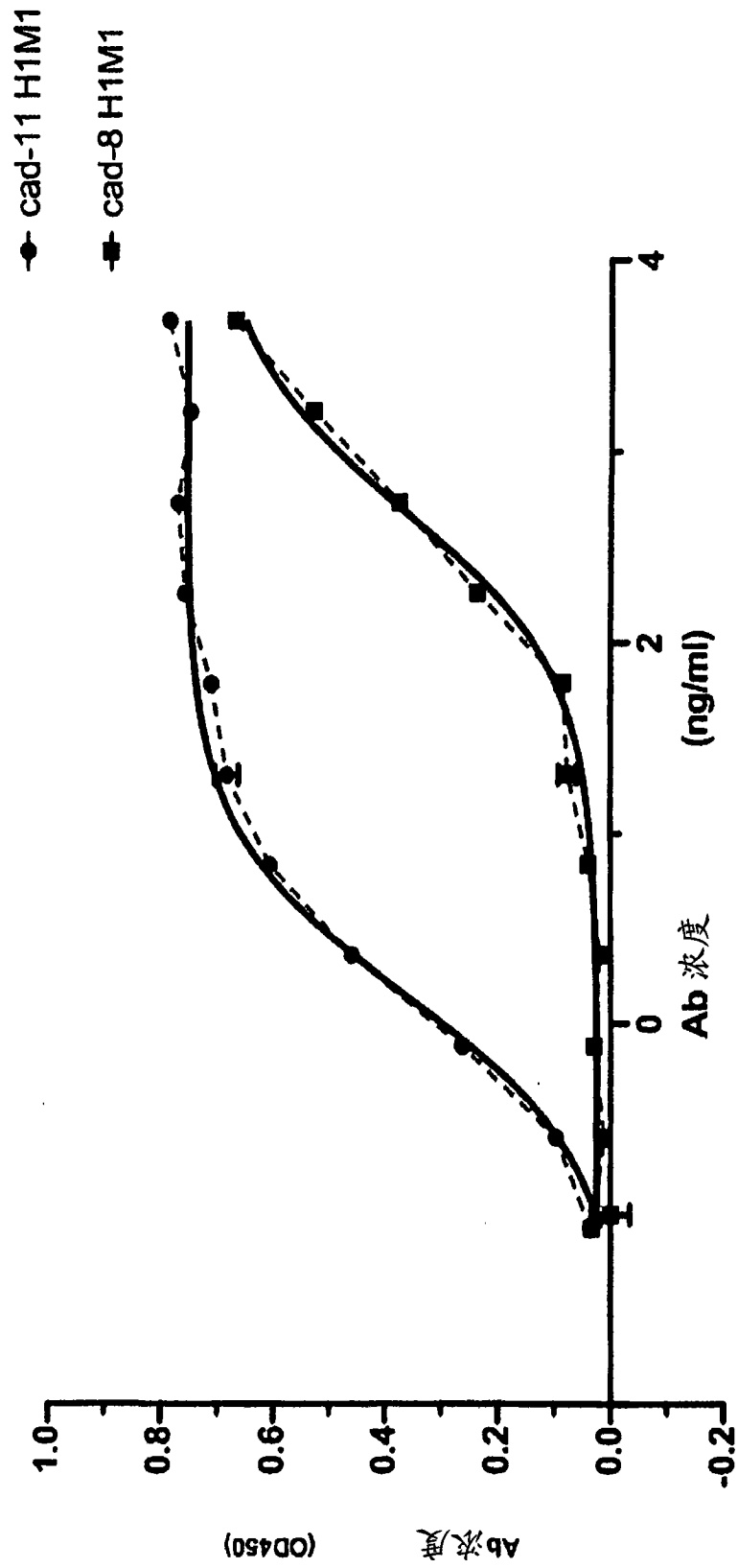


图 20

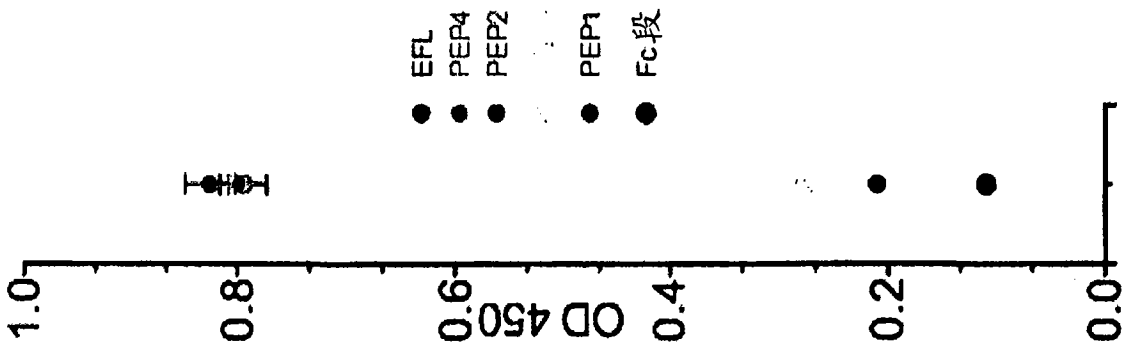


图 21A

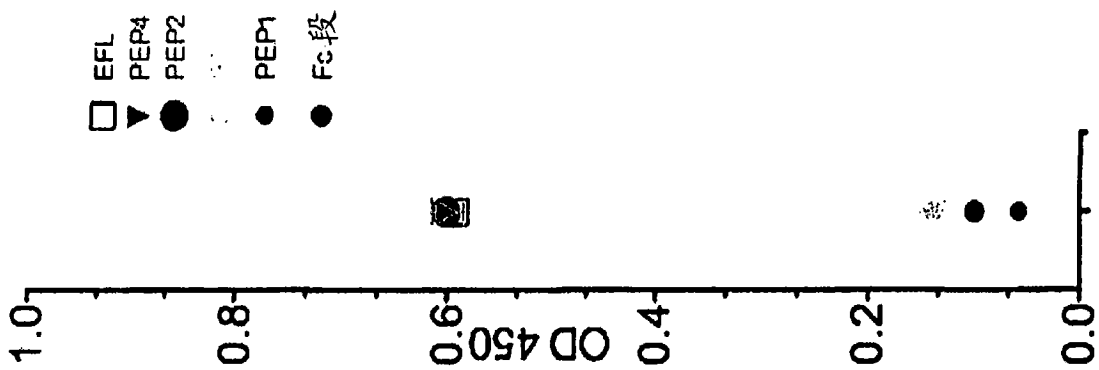


图 21B

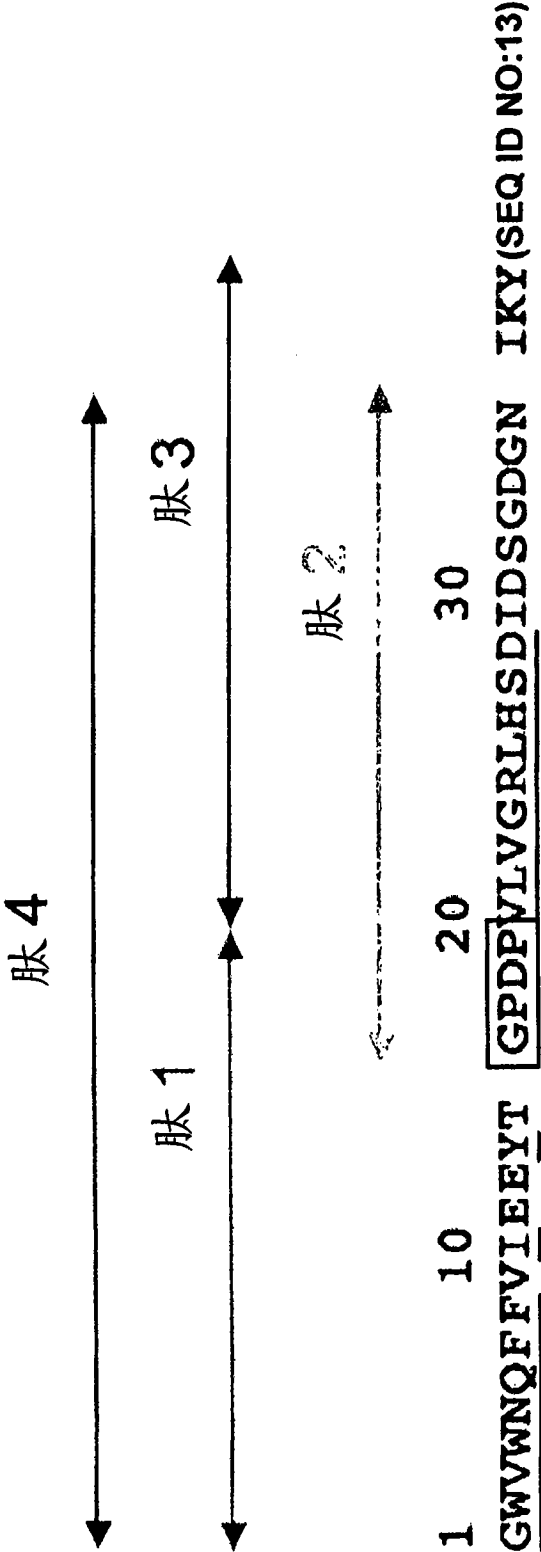


图 22

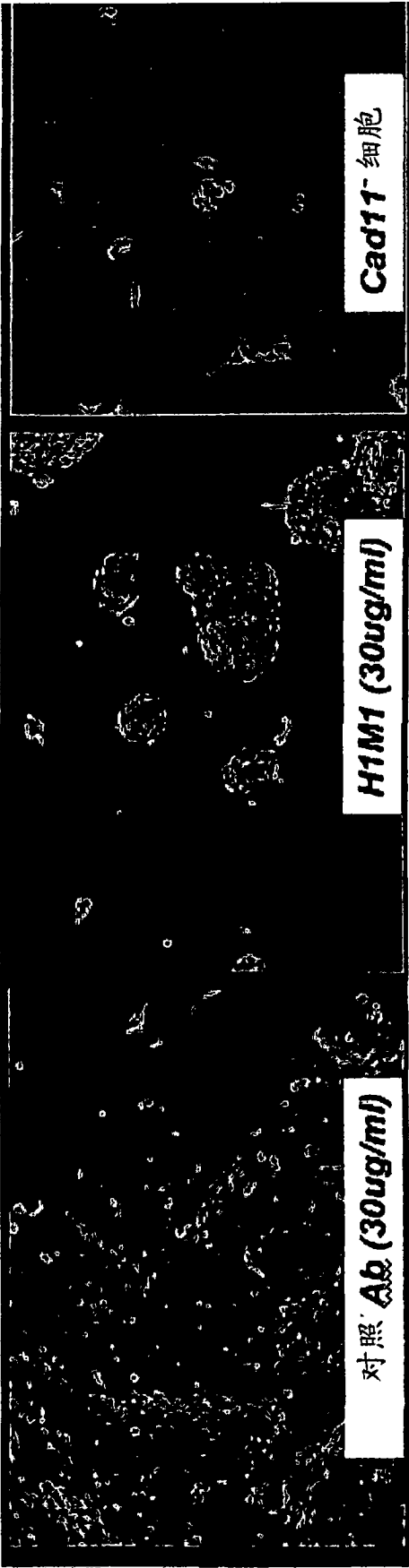


图 23A

图 23B

图 23C

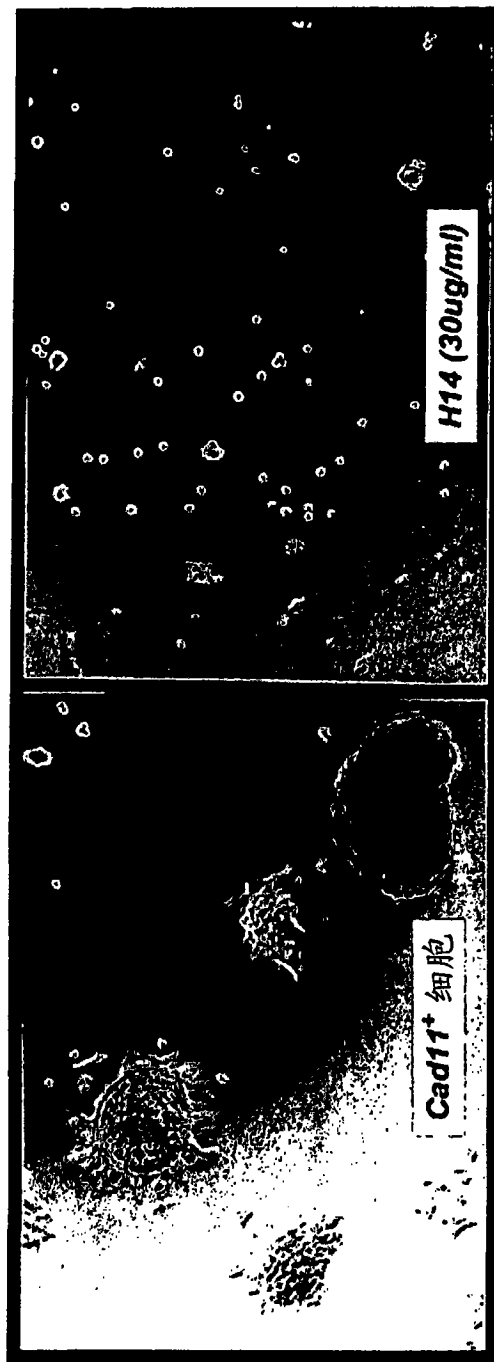


图 24A 40x 图 24B

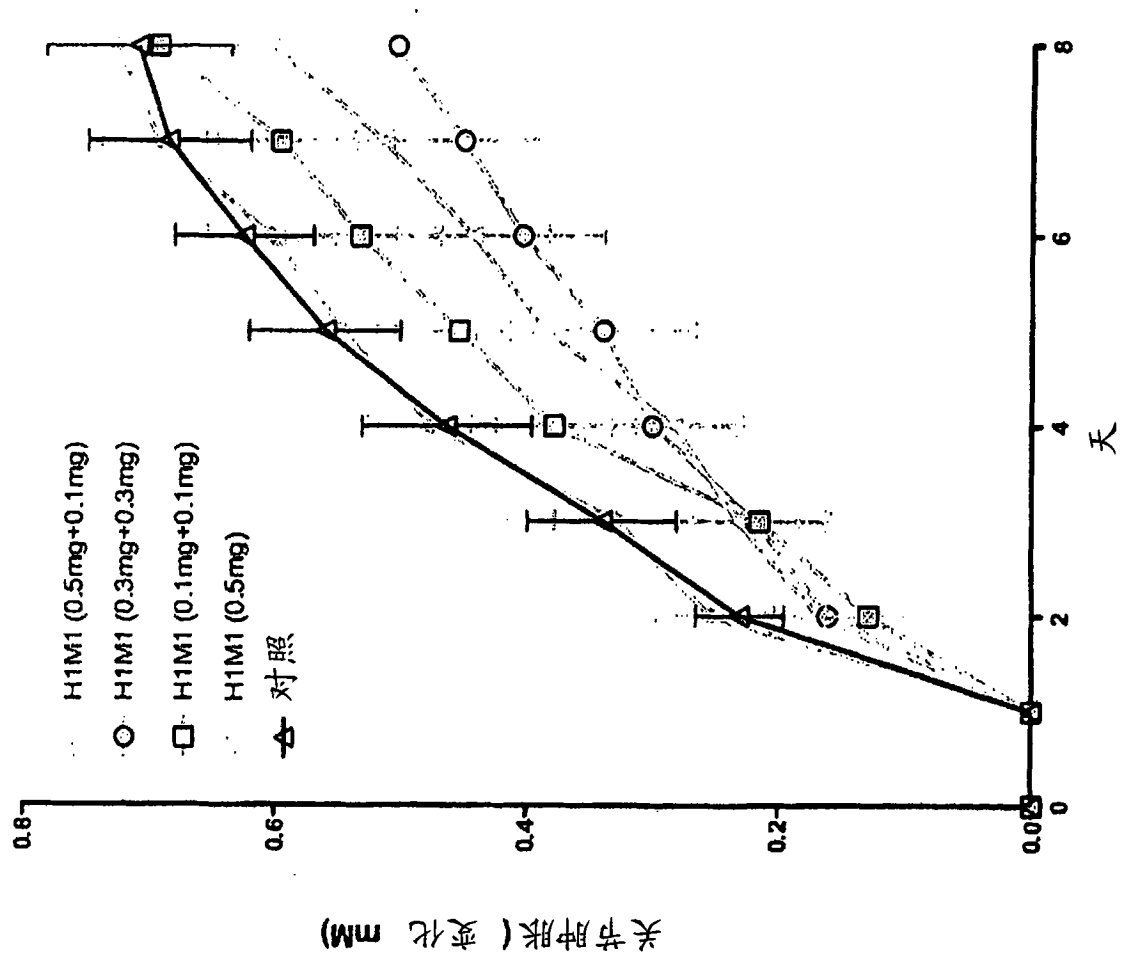


图 25

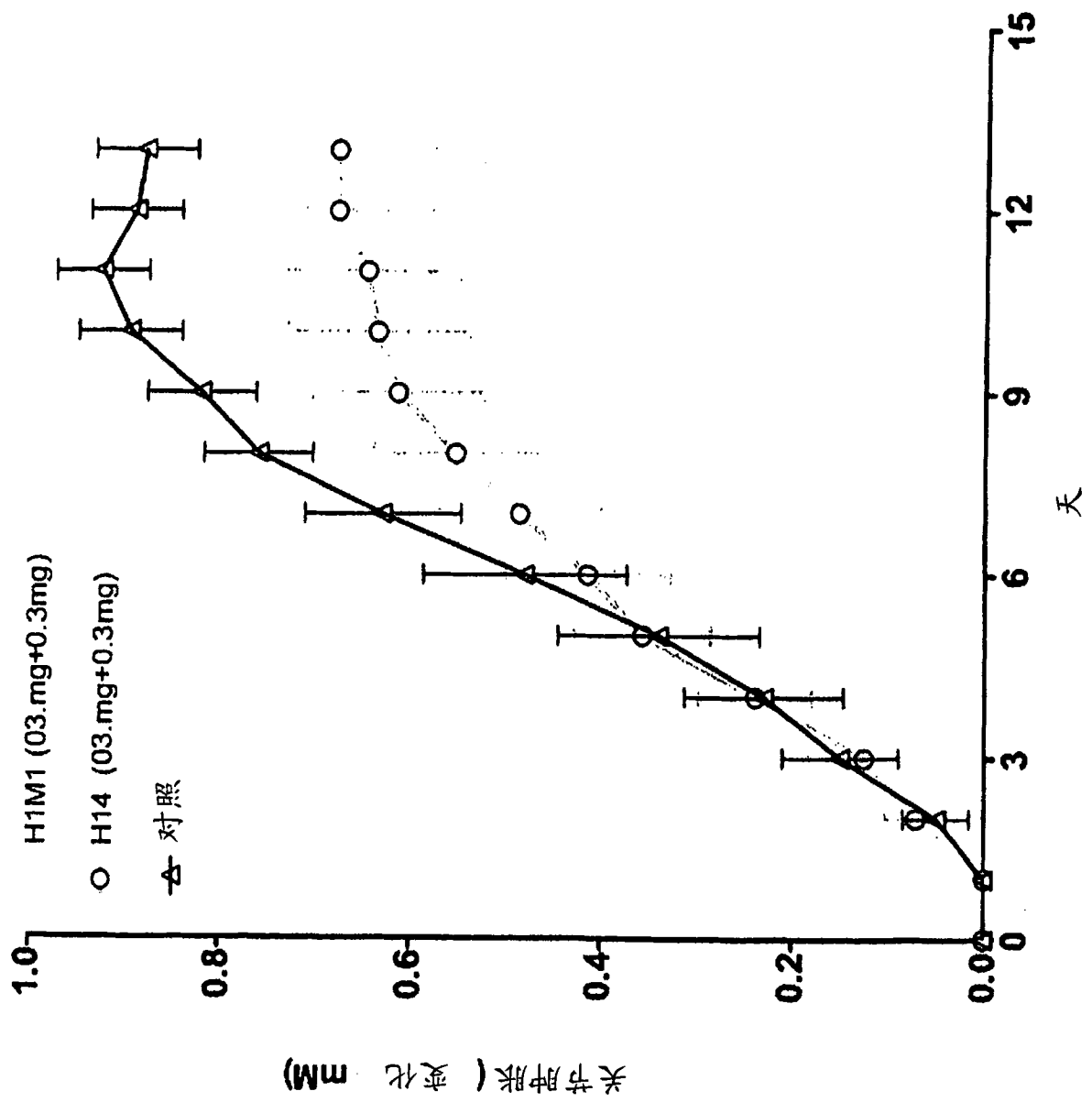


图 26

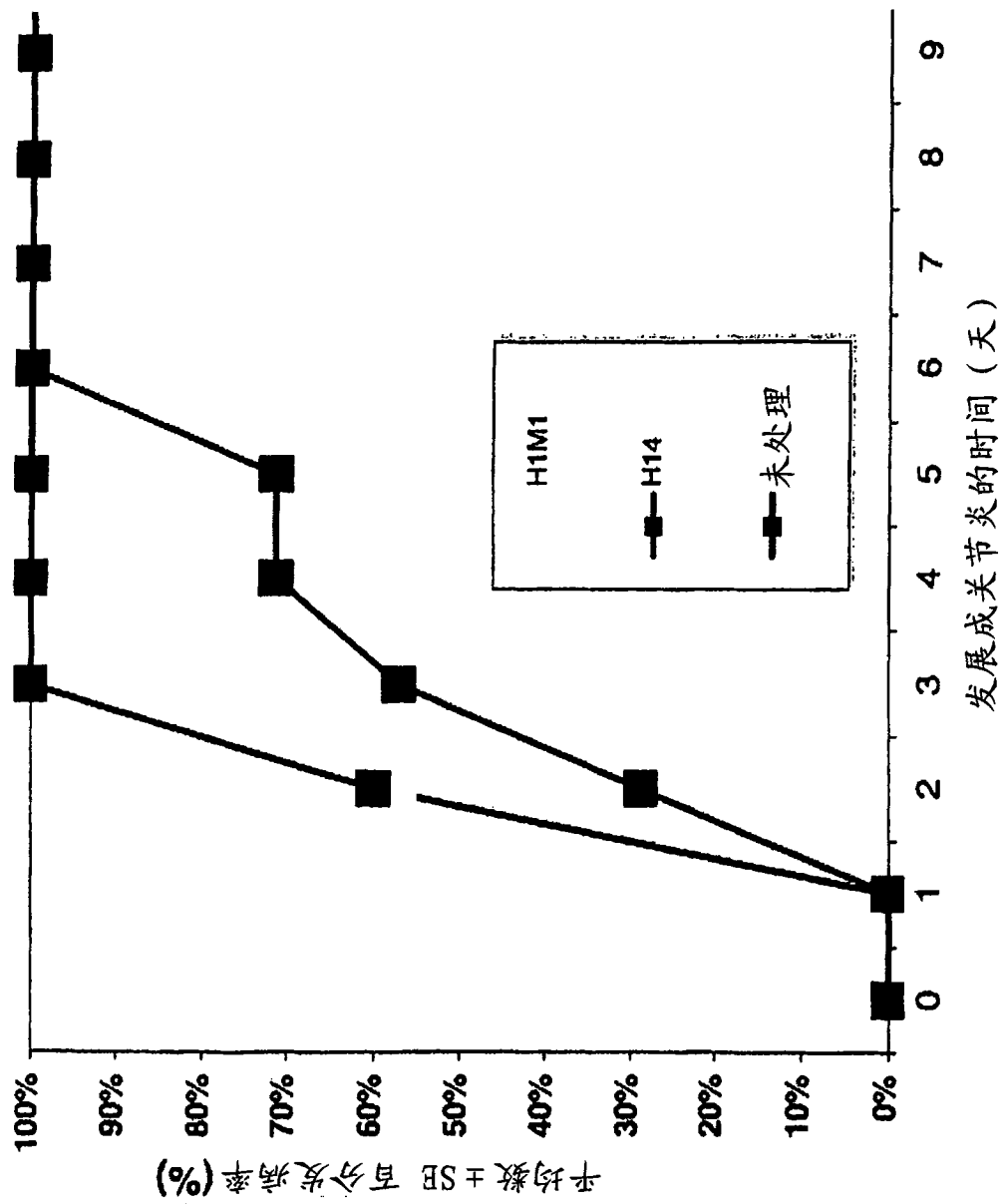


图 27

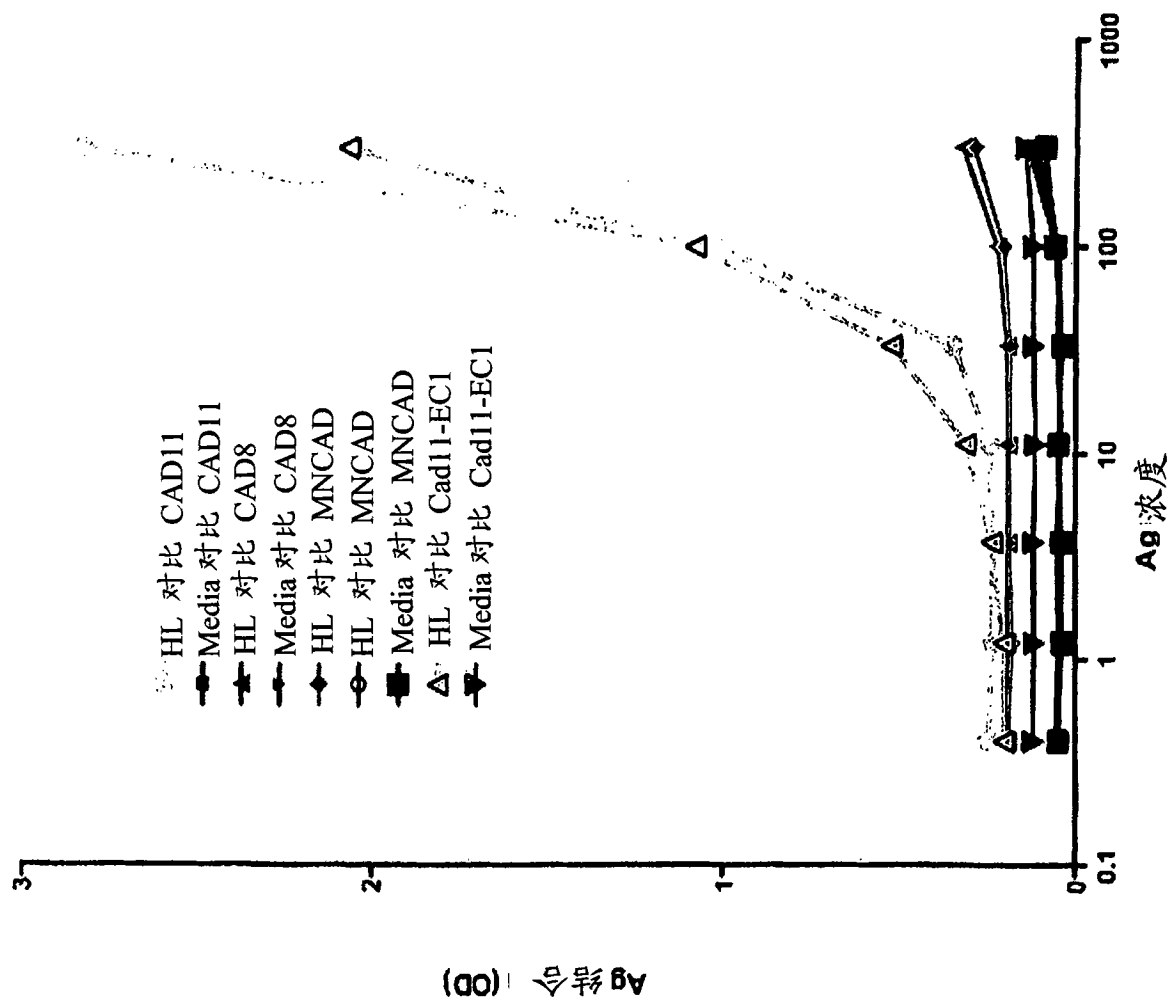


图 28

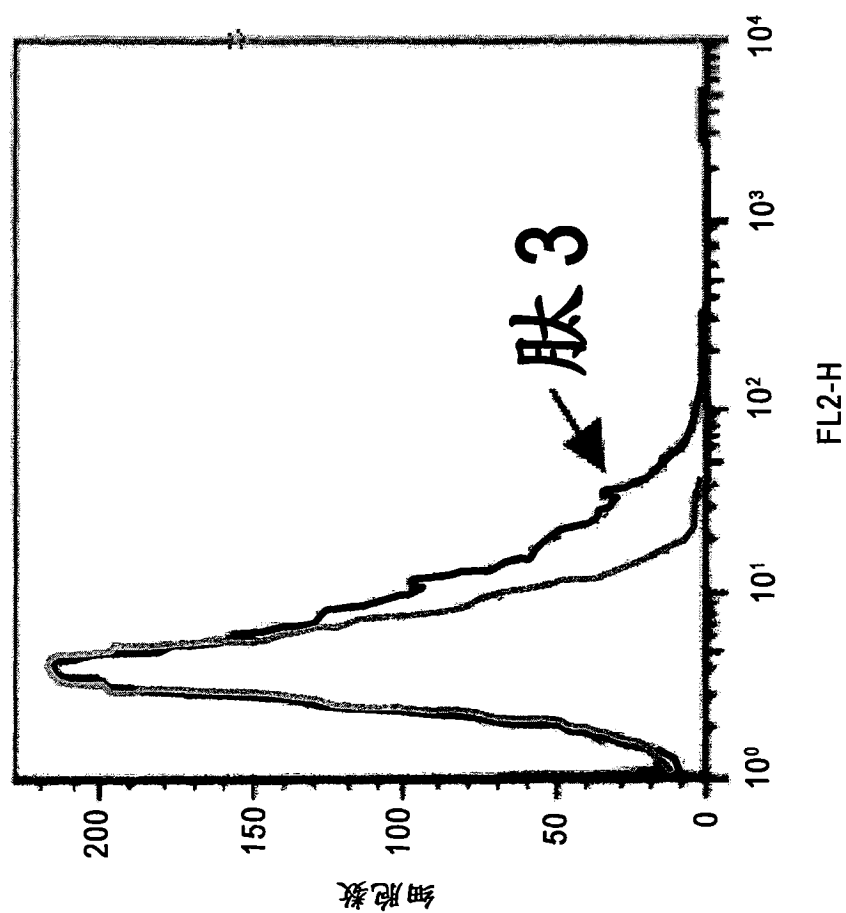


图 29